

Philipps



**Universität
Marburg**

**Fachbereich Biologie
- Entwicklungsbiologie -**

**Genetische und biochemische Analysen zur
Regulation der Arp2/3-Komplex vermittelten F-Aktin-
Plaques Bildung und Auflösung während der
Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tatjana Trinkewitz

aus Dillenburg

Marburg/Lahn, April 2013

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Prof. Dr. Susanne Önel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am:

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1. Zusammenfassung **1-2**

2. Einleitung **3-20**

2.1	Die Zell-Zell-Fusion	3
2.2	Die somatischen embryonale Muskulatur von <i>Drosophila melanogaster</i> entsteht durch Myoblastenfusion	4-5
2.3	Die zelluläre und ultrastrukturelle Ebene der Myoblastenfusion	5-8
2.4	Das transiente Signalzentrum, FuRMAS, ähnelt der Immunologischen Synapse und spielt eine zentrale Rolle bei der Verbindung der Zelladhäsion und der lokalen F-Aktin-Akkumulation mit den dynamischen Fusionsvorgängen während der Myoblastenfusion	8-9
2.5	Die Regulation der Aktin-Polymerisation an der Kontaktstelle der Myoblasten während eines Fusionsvorgangs	10-11
2.6	Das SH2-SH3 Adaptorprotein Dreadlock vermittelt in beiden Zelltypen die Arp2/3- basierte Aktin-Polymerisation während der Myoblastenfusion	11-12
2.7	Die Regulation der Myoblastenfusion durch Aktinmonomer-bindende Proteine: Profilin	12-13
2.8	Die Rho-GTPase Rac kontrolliert die Regulation des Scar-Komplexes und fördert somit die Assemblierung des F-Aktins an den kontaktierenden Myoblastenmembranen	13-15
2.9	Die Depolymerisation der Aktin-Filamente spielt eine kritische Rolle bei zahlreichen zellulären Aktivitäten und wird durch Aktinmonomer-bindende Proteine Cofilin/Twinstar und Twinfilin reguliert	15-17
2.10	Das Aip1 homologe Flare-Protein reguliert zusammen mit Cofilin/Twinstar die Disassemblierung des F-Aktins um die Dynamik des Aktin- Zytoskeletts aufrecht zu erhalten	17-19
2.11	Die Entwicklung der mononukleären und multinukleären Muskeln, die die männlichen adulten Reproduktionsorgane ummanteln	19-20

3. Zielsetzung der Arbeit **21-22**

4. Material **23-41**

4.1	Verwendete Chemikalien	23
4.2	Geräte	23-24
	4.2.1 Mikroskope	23

	4.2.2 Sonstige Geräte	23-24
4.3	Verwendete Kits und Sonstiges	24
4.4	Stocklösungen und Puffer	25-26
4.5	Medien und Platten	26-27
	4.5.1 Nähr- und Zuchtmedien für <i>Drosophila melanogaster</i>	26
	4.5.2 Nähr und Zuchtmedien für <i>E.coli</i>	26
	4.5.3 Nähr und Zuchtmedien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26-27
	4.5.4 MATCHMAKER Two-Hybrid-System 2	27
	4.5.5 MATCHMAKER Two-Hybrid-System 3	27
4.6	Enzyme	27-28
4.7	Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	28
4.8	Insekten Zellkulturlinie (<i>Drosophila melanogaster</i>)	28
4.9	Hefestämme (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	28-29
4.10	Antikörper	29
4.11	Vektoren und Konstrukte	29-31
4.12	Verwendete cDNAs	31
4.13	Verwendete Oligonukleotide	32-34
4.14	Fliegenlinien (<i>Drosophila melanogaster</i>)	34-41

5. Methoden 42-66

5.1	Genetische Arbeiten mit dem Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	42-46
	5.1.1 Stammhaltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	42
	5.1.2 <i>Drosophila</i> Kreuzungen	42-44
	5.1.2.A Ansetzen einer Kreuzung	42
	5.1.2.B Balancerlinien	42
	5.1.2.C Die ektopische Expression von Genen mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems	42-43
	5.1.2.D Erzeugung einer Doppelmutante	43-44
	5.1.3 Mikroinjektion modifizierter P-Element Vektoren in <i>Drosophila</i> Embryonen	44-45
	5.1.3.A Methode der Mikroinjektion	44-45
	5.1.3.B Mikroinjektion in <i>Drosophila</i> Embryonen	45
	5.1.3.C Etablierung transgener Fliegenstämme	45
	5.1.4 Sammeln von Embryonen	45-46

5.1.5	Formaldehydfixierung von <i>Drosophila</i> Embryonen	46
5.1.6	Hitzefixierung von <i>Drosophila</i> Embryonen	46
5.2	Histologische Methoden	46-51
5.2.1	Immunhistologische Färbung an fixierten <i>Drosophila</i> Embryonen - Diaminobenzidin-Färbung	46-47
5.2.2	Fluoreszenzfärbung an fixierten <i>Drosophila</i> -Embryonen	47-48
5.2.3	Immunologische Färbung an <i>Drosophila</i> Testes zum Sichtbarmachen der äußeren Muskelschicht	48
5.2.4	Immunologische Färbung an der indirekten Flugmuskulatur (IFM) von <i>Drosophila</i>	48
5.2.5	<i>In situ</i> -Hybridisierung an fixierten <i>Drosophila</i> -Embryonen	49-50
5.2.5.A	Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde	49
5.2.5.B	Qualitätstest für die DIG-markierte RNA-Sonde („Dot Blot“)	49
5.2.5.C	<i>In situ</i> -Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen	50
5.2.6	<i>In situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Testis, Ovarien und Imaginalscheiben	51
5.3	Molekularbiologische Methoden	52-63
5.3.1	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	52
5.3.2	Transformation von DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen	52
5.3.3	Plasmidpräparation aus einer 4 ml Über-Nacht-Kultur (<i>Mini-Präp</i>)	52-53
5.3.4	Plasmidpräparation aus einer 50 ml Über-Nacht-Kultur (<i>Midi-Präp</i>)	53
5.3.5	Test-Verdau zum Mini- bzw. Midi-Präp	53
5.3.6	Präparation von genomischer DNA aus <i>Drosophila melanogaster</i> für PCR-Reaktionen (single fly Methode)	53-54
5.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	54
5.3.8	Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	54-55
5.3.8.A	Primer-Design für PCR	55
5.3.9	Aufreinigung von DNA mittels Ethanol-Präzipitation	55
5.3.10	Klonierung eines PCR-Produkts in einen TopoTA-Vektor,	55-56

	TopoZeroBlunt-Vektor oder pEntr-Vektor	
5.3.11	Präparativer Restriktionsverdau eines Vektors für Klonierungen	56
5.3.12	Präparativer Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten für Klonierungen	56-57
5.3.13	Präparativer Restriktionsverdau eines mittels PCR amplifizierten DNA-Fragments	57
5.3.14	Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor	57-58
5.3.15	Die Durchführung einer <i>in vitro</i> zielgerichteten Mutagenese	58
5.3.16	Das Hefe-Zwei-Hybrid System	59-63
5.3.16.A	Das Modell des Hefe-Zwei-Hybrid Systems	59
5.3.16.B	Herstellung von Hefenährmedien	60
5.3.16.C	Transformation der Plasmid-DNA in die Hefezellen nach der Lithiumacetat Methode, um eine direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen	61
5.3.16.D	Transformation der Hefezellen für einen Screen	61-62
5.3.16.E	Isolation der Plasmid-DNA aus den positiven Hefeklonen	62-63
5.4	Zellkulturexperimente an der <i>Drosophila</i> Schneiderzelllinie SL2	63-66
5.4.1	Haltung und Aussäen der Schneiderzellen (SL2)	63
5.4.2	Transfektion der SL2-Zellen	63-64
5.4.3	Fixierung der SL2-Zellen und Antikörperfärbung	64-65
5.4.4	Nachweis der Protein-Protein Interaktion <i>in vivo</i> mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay)	65-66

6. Ergebnisse 67-124

6.1	Die Arp2/3-abhängige Aktin-Polymerisation basiert auf der genetischen Interaktion von Vrp1/Wip mit dem Adaptorprotein Dock, wird jedoch auch durch andere Faktoren reguliert	67-70
6.2	6.2 Weitere Komponente, die an der Aktin-Polymerisation beteiligt sind	70-75
6.2.1	Das Aktinmonomer-bindende Protein Chic interagiert auf genetischer Ebene mit den Komponenten der Arp2/3-gesteuerten Aktin-Polymerisation: <i>wasp</i> , <i>wip</i> und <i>scar</i>	70-74

	6.2.2 <i>chic</i> interagiert genetisch mit dem Aktin-Nukleator <i>ena/Vasp</i> während der Wegfindung der ventralen Muskeln und geringfügig während der Myoblastenfusion	74-75
6.3	Analysen der Muskel-spezifischen RhoGTPasen Rac1 und Rac2 während der Muskelbildung von <i>Drosophila</i>	75-106
	6.3.1 Die Schlüsselfunktion der GTPase Rac1 während <i>Drosophila</i> Myoblastefusion wird durch die Blockade der Fusionsereignisse in den konstitutiv-aktiven und dominant-negativen induzierten Mutanten bestätigt	76-77
	6.3.2 Rac1 und Rac2 sind wichtige Aktin-regulatorische Komponente der Myoblastenfusion, dennoch werden in den stark zerstörten <i>racV12</i> , <i>racN17</i> und <i>rac1^{J11}</i> , <i>rac2^Δ</i> Mutanten noch Aktin-Plaques gebildet	77-78
	6.3.3 Die Rho GTPasen <i>rac1</i> und <i>rac2</i> interagieren im Hefe-2-Hybrid System mit <i>chic</i>	78-80
	6.3.4 Die Mesoderm-spezifische Expression von Rac2-fl erzeugt eine komplette Rettung der Fusionsstörungen von <i>rac1</i> , <i>rac2</i> -Doppelmutanten und bereitet die Basis für die Herstellung von funktionellen Konstrukten für die Suche nach Interaktionspartnern im Hefe-2-Hybrid System	80-82
	6.3.5 Die Durchführung eines Hefe-2-Hybrid-Screens mit der aktivierten Form von Rac1 und Rac2 deckt neu potentielle Interaktionspartner der GTPasen auf	82-97
	6.3.5.A Mutantenanalyse und Ermittlung der mRNA Transkription der potentiellen Interaktionspartner für Rac1V12	86-92
	6.3.5.B Die mittels Hefe-2-Hybrid Screens identifizierte Interaktionspartner für Rac2V12	92-97
	6.3.6 Analyse der in <i>Drosophila</i> identifizierten Rho GAP-Proteine bezüglich deren Funktion bei der Myogenese	97-100
	6.3.7 Die GTPase Rac interagiert vermutlich indirekt mit Scar/Wave	100-102
	6.3.8 Die Aktivierung der Scar-Komplexes wird vermutlich durch die Interaktion von redundant wirkenden Rac-GTPasen mit den Komplex-Komponenten Kette und Sra1 gewährleistet	103-106
6.4	Der konservierte Aktin-depolymerisierende Faktor Tsr ist während der Myogenese ubiquitär exprimiert	106-110
	6.4.1 Die aus anderen Systemen bekannte Rac1-gesteuerte Regulation der Tsr-Phosphorylierung kann für die <i>Drosophila</i> Myoblastenfusion nicht verifiziert werden	110-111
6.5	Das <i>Aip1</i> homologe <i>flare</i> wird während der Embryogenese, der Oogenese, in den adulten Testes sowie in larvalen Imaginalscheiben transkribiert	111-115

6.5.1	Die Expression des UAS-flare-GFP in der embryonalen Muskulatur, den dorsalen indirekten Flugmuskeln sowie in den Reproduktionsorganen zeigt eine gewebespezifische Proteinlokalisierung	115-119
6.5.2	Die Expression des <i>UAS-flare-RNAi</i> in der embryonalen Muskulatur, dorsalen indirekten Flugmuskulatur sowie in männlichen Reproduktionsorganen bewirkt keine Störungen	119-120
6.6	Analyse der Aktin-depolymerisierenden Proteine und ihre potentielle Rolle bei der Auflösung der Aktin-Plaques auf der Seite der FCMs während der Myoblastenfusion in <i>Drosophila</i>	120-124

7. Diskussion 125-148

7.1	Das Adaptor-Protein Dock ist an der Aktivierung der Signalkaskade, die in eine Arp2/3-basierte F-Aktin-Polymerisation in FCs und FCMs mündet, beteiligt	126-128
7.2	Chic interagiert während der Myoblastenfusion mit den Regulatoren der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation	128-129
7.3	Potentielle Funktionen von Chic in der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisierung während der Myoblastenfusion	130-132
7.4	Die genetische Interaktion von <i>chic</i> und <i>ena/Vasp</i> ist möglich	132-133
7.5	Das Aktinmonomer-bindende Protein Chic interagiert auf biochemischer Ebene mit den Rac-GTPasen	133-135
7.6	Die Rac GTPasen sind in die Aktin-basierte Prozesse während der Myoblastenfusion von <i>Drosophila</i> involviert	135-136
7.7	Die neu Rac1V12-Linie, die mit Hilfe der Φ -Integrase auf das dritte Chromosom integriert wurde, weist, im Vergleich zu den von Luo <i>et al.</i> (1994) generierten Linien, einen schwächeren Phänotyp auf	136-138
7.8	Eine potentielle Funktion der im Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten putativen Interaktionspartnern für die Myoblastenfusion	139-141
7.9	Von den phänotypisch analysierten GAPs scheint Tum während der Myogenese eine Rolle zu spielen	141
7.10	Die Aktivierung des Scar-Komplexes durch die GTPasen Rac1 und Rac2 wird vermutlich über die Interaktion mit Sra1 und/oder Kette reguliert	142-144
7.11	Die Rac1-gesteuerte Regulation der Tsr-Phosphorylierung kann für die <i>Drosophila</i> Myoblastenfusion nicht verifiziert werden	144-145
7.12	Der depolymerisierungsfördernde Kofaktor Flr wird Mesoderm-spezifisch transkribiert und weist vermutlich eine genetische	145-147

Interaktion mit Tsr auf

7.13	Potentielle Redundanzwirkung von Flr und Tsr mit anderen bekannten F-Aktin-depolymerisierenden Faktoren	147-148
------	---	---------

8. Literaturverzeichnis	149-169
--------------------------------	----------------

9. Anhang	170-175
------------------	----------------

9.1	Danksagung	170-171
9.2	Erklärung gem. § 5 der Promotionsordnung	172
9.3	Lebenslauf	173-174
9.4	Teilnahme an Workshops und Tagungen	175

1. Zusammenfassung

Die Fusion der Myoblasten ist ein fundamentaler Prozess bei der Muskelbildung multizellulärer Organismen. Ein hierfür gut untersuchter Modellorganismus ist *Drosophila melanogaster*, bei welchem die Bildung der somatischen Muskulatur durch die Fusion von Founderzellen (FCs) und fusionskompetenten Myoblasten (FCMs) vollzogen wird. Das eigentliche Fusionsereignis wird durch das spezifische Erkennen und die Adhäsion der beiden Zellpopulationen mit Hilfe der Transmembranproteine eingeleitet. Anschließend wird das Signal intrazellulär an das Aktin-Zytoskelett weitergeleitet, was die Bildung der Fusionsporen und die Verschmelzung der Membranen zur Folge hat. Dabei wird an der Kontaktstelle der fusionierenden Myoblasten ein Adhäsionsring gebildet, in dessen Mitte sich ein Aktin-reiches Zentrum befindet (Kesper *et al.*, 2007). Lebend-Untersuchungen haben gezeigt, dass sich dieser Aktin-Plaques sehr dynamisch verhält und innerhalb von zwei Minuten seine maximale Größe erreicht. Die Auflösung der Plaques dauert nur eine Minute. Mutantenanalysen zeigen, dass die Arp2/3-abhängige Aktin-Polymerisation essentiell für die Myoblastenfusion ist. Die Dynamik der Aktin-Plaques lässt zudem vermuten, dass die Depolymerisation ebenfalls eine entscheidende Rolle spielt. Um diese F-Aktin-basierten Prozesse genauer zu analysieren, wurden in dieser Arbeit mehrere Ansätze verfolgt.

Die Arp2/3-abhängige Aktin-Plaques Bildung wird durch die NPFs Scar/Wave und WASP in FCs und FCMs reguliert. Mutationen in der Scar/Wave- als auch der WASP-abhängigen Arp2/3-Aktivierung resultieren in einer Reduktion der Aktin-Plaques, aber nicht in einem Verlust der Aktin-Plaques Bildung (diese Arbeit, Sens *et al.*, 2010). Es wurde daher in dieser Arbeit nach weiteren Komponenten gesucht, die an der Aktin-Plaques Bildung beteiligt sind, wie z.B. das Aktinmonomer-bindende Protein Profilin/Chic (Chic). Die hier durchgeführten Dosisexperimente und Protein-Interaktionsstudien deuten daraufhin, dass Chic sowohl eine Komponente der Scar/Wave- als auch der WASP-abhängigen Aktin-Polymerisation ist. Des Weiteren konnte in diesem Zusammenhang der Arp2/3-Regulator Ena/VASP als eine mögliche neue Komponente der Arp2/3-vermittelten Aktin-Polymerisation während der Myoblastenfusion und der Muskelanheftung identifiziert werden.

Ein weiterer Teil meiner Arbeit befasst sich mit der Aktivierung des Scar-Komplexes während der Myoblastenfusion. Dieser erfolgt durch die kleine Rho GTPase Rac bzw. durch ein Zusammenwirken von Rac mit den Komponenten des pentameren Scar-Komplexes. In *Drosophila* gibt es drei Rac GTPasen, von denen Rac1 und Rac2 während der Myoblastenfusion redundant wirken. Die Expression der konstitutiv-aktiven und dominant-

1. ZUSAMMENFASSUNG

negativen Konstrukte von Rac1 resultiert in einem starken Fusionsphänotyp. Auch die Doppelmutanten für *rac1*- und *rac2* zeigen unfusionierte Myoblasten. In allen Mutanten konnte ich noch die Bildung von Aktin-Plaques beobachten. Zudem zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten biochemischen und genetischen Interaktionsstudien eine Interaktion von Rac mit Chic, Scar/Wave, Sra-1 und Kette. Um Aktivatoren bzw. Inaktivatoren für die beiden Rac GTPasen aufzudecken, wurde unter Verwendung der aktivierten Form von Rac1 und Rac2 ein globaler Hefe-2-Hybrid Screen durchgeführt. Unter den potentiellen Interaktionspartnern für Rac1 während der Myoblastenfusion konnten die Csk-Kinase und das Aktin-bindende Protein WupA identifiziert werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Suche nach Aktin-depolymerisierenden Komponenten, die am Membranzusammenbruch während der Fusion beteiligt sind. Dabei wurden Mutationen im Depolymerisierungsfaktor Cofilin/Twinstar (Tsr) auf Fusionsstörungen untersucht. Weder homozygote *tsr*-Mutanten zeigten Defekte in der Fusion der Myoblasten, noch die Expression von aktivierten bzw. inaktiviertem Tsr in Myoblasten. Daraufhin wurde ein weiterer Kofaktor, Aip1/Flare (Flr), bezüglich seiner mRNA-Expression analysiert und Doppelmutantenanalysen mit *tsr* durchgeführt. Die Lokalisation des *flr* Transkripts konnte dabei in der embryonalen somatischen Muskulatur nachgewiesen werden, sowie auch in den Ovarien, im Testis und in den Imaginalscheiben. Allerdings zeigen *flr*-Einzelmутanten keine Muskeldefekte. In *tsr;flr*-Doppelmutanten konnten jedoch schwache Muskelstörungen beobachtet werden, was auf ein potentiellies Zusammenwirken der beiden Proteine während der Muskelbildung hindeutet. Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen postulieren, dass Tsr in funktioneller Redundanz mit weiteren depolymerisierenden Proteinen wirkt.

2. Einleitung

2.1 Die Zell-Zell-Fusion

Die Zell-Zell-Fusion ist ein hochregulierter dynamischer Prozess, bei welchem mononukleäre Zellen miteinander verschmelzen um ein Synzytium zu bilden. Dieser Vorgang spielt eine fundamentale Rolle in der Entwicklung von Organismen. Während der Fertilisation verschmelzen haploide Ei- und Spermiumzelle um eine diploide Zygote zu bilden. Weiter fusionieren in der Embryonalentwicklung Trophoblastenzellen um dem wachsenden Embryo die Einnistung in die Gebärmutterwand zu ermöglichen. Auch die Differenzierung und Reparatur von Muskel- und Knochenzellen ist abhängig von der Zellfusion (Chen *et al.*, 2007; Chen und Olson, 2005; Oren-Suissa und Podbilewicz, 2007). Obwohl unterschiedliche Zelltypen miteinander fusionieren, so scheint doch der Fusionsprozess auf zellulärer Ebene partiell konserviert zu sein (Nowak *et al.*, 2009; Abmayr und Pavlath, 2012).

Die Zellfusion wird durch die chemotaktisch gesteuerte Migration initiiert. Nach einer erfolgreichen Erkennung adhären die Zellen, wodurch es zum ersten Zellkontakt kommt. Dabei werden die Membranen so dicht zusammengebracht, dass die Lipiddoppelschichten beider Zellen verschmelzen. An die Kontaktstelle werden Adhäsionsmoleküle rekrutiert und eine oder mehrere Fusionsporen werden gebildet. Während dieser Zeit unterliegen die Zellen zahlreichen Umstrukturierungen und Formveränderungen. Hierbei ist die exakte räumliche und zeitliche Regulation des Aktin-Zytoskeletts von enormer Bedeutung. Charakteristisch für den Fusionsprozess ist die Bildung von F-Aktin an den Kontaktmembranen. Im weiteren Verlauf kommt es zur Expansion der Fusionspore, wodurch die zytoplasmatische Kontinuität erreicht wird, und die beiden Zellen verschmelzen (Chen *et al.*, 2008). Eine spezielle Art der Zell-Zell-Fusion ist die Myoblastenfusion, welche in Vertebraten einen grundlegenden Mechanismus für die Bildung der Skelettmuskulatur, sowie für die Reparatur von Muskeln, darstellt.

Das holometabole Insekt *Drosophila melanogaster* ist ein genetisch leicht manipulierbarer Modellorganismus, welcher sich gut für die Grundlagenforschung eignet um wichtige Aspekte in Bezug auf die medizinische Relevanz von konservierten Faktoren aufzudecken. Die Muskulatur des Insekts ist, wie in Vertebraten, syncytial aufgebaut und entsteht durch die Fusion von mononukleären Myoblasten. Obwohl viele Mechanismen und Signalwege der Myoblastenfusion bereits bekannt sind, schaffen neue identifizierte Gene und modernere Techniken die Basis für weitere Forschungen.

2.2 Die somatischen embryonale Muskulatur von *Drosophila melanogaster* entsteht durch Myoblastenfusion

Die Entstehung der einzelnen Muskelfasern ist ein von der Fliege bis zum Säuger größtenteils konservierter Prozess, welcher durch ein Netzwerk aus signalgebenden und transkriptionellen Faktoren initiiert wird um Myoblastenpopulationen zu spezifizieren. Im nächsten Schritt wird durch molekulare und biologische Regulation die Orientierung, Anheftung und Innervierung der Muskeln vollzogen (Richardson *et al.*, 2008a). Die Körperwandmuskulatur eines sich entwickelnden *Drosophila* Embryos ist durch ein repetitives Muster charakterisiert (Abb. 2.1, A). So wird in jedem abdominalen Hemisegment ein Muskelmuster aus 30 somatischen Muskelfasern gebildet, die sich durch Form, Orientierung und Größe auszeichnen (Bate, 1990) (Abb. 2.1, B). In Vergleich zur Wirbeltiermuskulatur, die aus zahlreichen Muskelfaserbündeln geformt wird, ist in *Drosophila* jeder Muskel eine einzelne Muskelfaser, die aus dem Fusionsereignis einer Founderzelle (FC) mit mehreren fusionskompetenten Myoblasten (fusion competent myoblasts, FCMs) hervorgeht. Die beiden Zelltypen gehen aus dergleichen Population innerhalb des somatischen Mesoderms hervor. Das Schicksal der FCs wird durch die Notch-Delta vermittelte laterale Inhibition und asymmetrischer Zellteilung determiniert. (Dworak und Sink, 2002; Tixier *et al.*, 2010). Diese FC-Population bestimmt die Identität jedes Muskels und ist durch die kombinierte Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise, Krüppel, Even-skipped, Slouch, Apterous und Nautilus, charakterisiert (Baylies *et al.*, 1998; Beckett und Baylies, 2007; Carmena *et al.*, 2006; Frasch, 1999). Auf diesem Weg wird Morphologie, Anzahl der Fusionsereignisse sowie die Größe der fertigen Muskeln festgelegt. Einst spezifiziert, rekrutieren die FCs die umliegenden FCMs um die Fusion zu initiieren. Im Gegensatz zu FCs, zeichnen sich die FCMs durch die Expression eines Identitätsfaktors der Gli-Familie, *Lame Duck* (*Lmd*) aus und tragen wahrscheinlich zur Größe der Muskeln bei (Duan *et al.*, 2001; Ruiz-Gomez *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die migrierenden, chemotaktisch angezogene FCMs Filopodien und Lamellipodien ausbilden, um größere Entfernungen überbrücken zu können (Richardson *et al.*, 2008). Nach der FC-FCM-Fusion wird das Genom der FCMs so umprogrammiert, dass diese mit der Expression der FC-spezifischen Transkriptionsregulatoren beginnt (Baylies *et al.*, 1998).

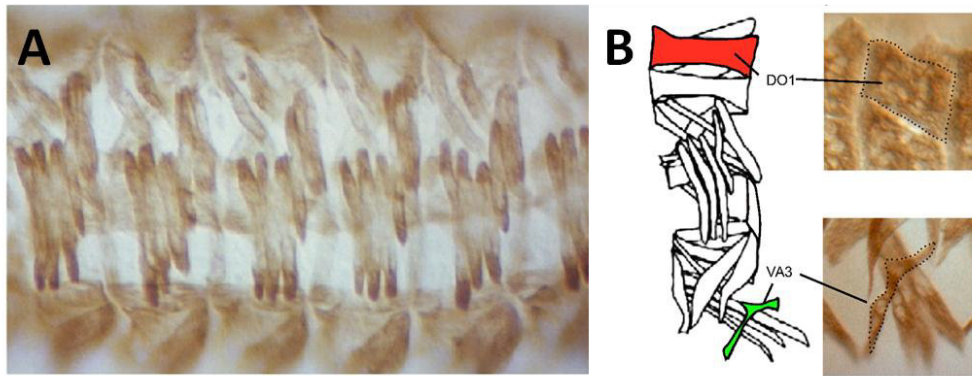


Abb. 2.1: **Bildung der embryonalen Muskulatur mittels Myoblastenfusion.** A: Dargestellt ist ein wildtypisches, repetitives Muskelmuster eines *Drosophila* Embryos im 16-ten Entwicklungsstadium, angefärbt mit einem Antikörper, gerichtet gegen das Muskelmyosin. B: Links: Schematische Darstellung eines Hemisegments, bestehend aus 30 unterschiedlichen Muskeln. Die farblich hervorgehobenen Muskeln (DO1 (rot) und VA3 (grün)) verdeutlichen die Unterschiede in Form und Größe. Rechts: Vergrößerung der DO1 und VA3 Muskeln eines wildtypischen Embryos, visualisiert durch anti-Muskelmyosin (Abgeändert nach Abmayr und Pavlath, 2012).

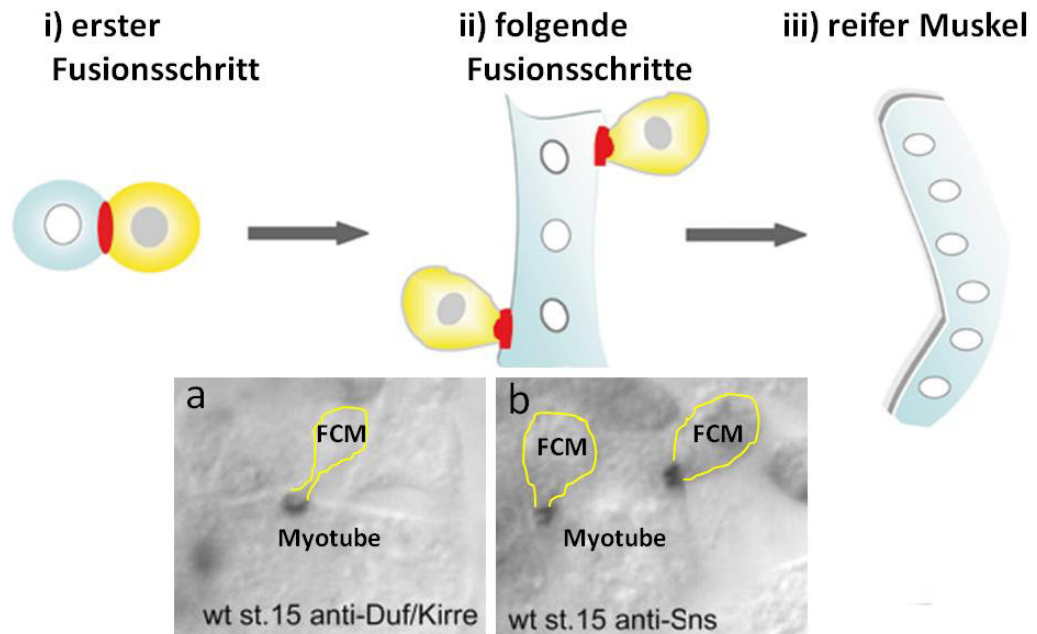
Im *Drosophila* Embryo ist die Myoblastenfusion ein sich wiederholender Prozess, welcher von Stadium 12 bis 15, innerhalb von 5,5 Stunden, vollendet wird (Beckett und Baylies, 2007). Die Größe jedes Muskels korreliert mit der Anzahl der Fusionsereignisse, die zwischen zwei und 25 variieren kann (Bate, 1990). Beobachtungen haben gezeigt, dass der Fusionsvorgang in zwei temporalen Phasen stattfindet. Während der ersten dreistündigen Phase fusioniert eine FC mit FCMs um eine binukleäre oder trinukleäre Precursor-Zelle zu bilden. In der zweiten temporalen Phase expandiert diese Vorläuferzelle durch die Fusion weiterer FCMs bis die endgültige Muskelgröße erreicht ist (Dobberstein *et al.*, 1997; Mohler *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2008; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009).

2.3 Die zelluläre und ultrastrukturelle Ebene der Myoblastenfusion

Während der Entwicklung der pränatalen Vertebratenmuskulatur werden durch die Fusion einkerniger Myoblasten mehrkernige Muskelfasern gebildet. Aber auch nach der Geburt findet im Organismus im begrenzten Maße die Bildung der Muskeln durch Myoblastenfusion statt. Dabei werden die unter der Basalmembran der Skelettmuskelfasern sitzende Stammzellen, so genannten Satellitenzellen, aktiviert und in das Wachstum und die Regeneration der Muskeln einbezogen. In *Drosophila* basiert die Myoblastenfusion auf dem dynamischen Verhältnis zwischen FCs und FCMs, die im ersten Schritt eine Vorläuferzelle bilden und in der zweiten temporalen Phase durch zahlreiche Fusionsereignisse die fertige syncytiale Myotube generieren (Bate, 1990; Rau *et al.*, 2001) (Abb. 2.2, A). Nach der erfolgreichen Zellerkennung, Adhäsion und Ausrichtung der Myoblasten kommt es bei der heterologen Fusion zum Zusammenbruch der Membranen und Zellverschmelzung. Diese

Vorgänge wurden umfangreich auf der ultrastrukturellen Ebene unter Verwendung der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) charakterisiert (Doberstein *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2008; Gildor *et al.*, 2009). Dabei konnten in der zweiten Fusionsphase elektronendichte Strukturen beobachtet werden, die diese noch weiter unterteilen (Abb. 2.2, B). Zuerst akkumulieren elektronendichten Vesikel an den gegenüberliegenden Membranen zwischen FC oder wachsender Myotube und FCMs um einen Präfusionskomplex zu bilden (Abb. 2.2, B und C). Die Abwesenheit derselben Strukturen in der ersten Fusionsphase lässt deren ausschließliche Präsenz während der zweiten Phase vermuten, aber auch ihre Kurzlebigkeit und seltenes Vorkommen dürfen als Grund nicht außer Acht gelassen werden (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Die parallel angeordneten Vesikelpaare des Präfusionskomplexes können auf jeder Kontaktseite eine räumliche Verteilung von über 1 µm einnehmen. Im weiteren Fusionsverlauf wird eine Auflösung der Vesikel postuliert, während an den Kontaktmembranen elektronendichte, Desmosom-ähnliche Plaques beobachtet werden können (Doberstein *et al.*, 1997, Getsios *et al.*, 2004) (Abb. 2.2, B und D). Die Herkunft der elektronendichten Strukturen ist bislang unbekannt. Interessanterweise konnten elektronendichte Plaques zu keiner Zeit gleichzeitig mit den elektronendichten Vesikel des Präfusionskomplexes beobachtet werden, was die Hypothese stützt, dass die Verschmelzung elektronendichter Vesikel die Bildung der Plaques nach sich zieht. Abschließend kommt es zur Vesikulierung der Membranen zwischen den fusionierenden Myoblasten und zur Bildung von mehreren Fusionsporen, sodass eine zytoplasmatische Kontinuität von bis zu 4 µm erreicht werden kann (Abb. 2.2, B und E). Die Fusion ist beendet, wenn die FCMs in die wachsende Myotube integriert werden (Übersichtsartikel, Önel, 2009; Sens *et al.*, 2010). Zudem wurde kürzlich in Sens *et al.* (2010) postuliert, dass von den FCMs ausgehende invasive Podosom-ähnliche Strukturen die Bildung der Fusionsporen begünstigen.

A Myoblastenfusion auf der zellulären Ebene



B Myoblastenfusion auf der ultrastrukturellen Ebene

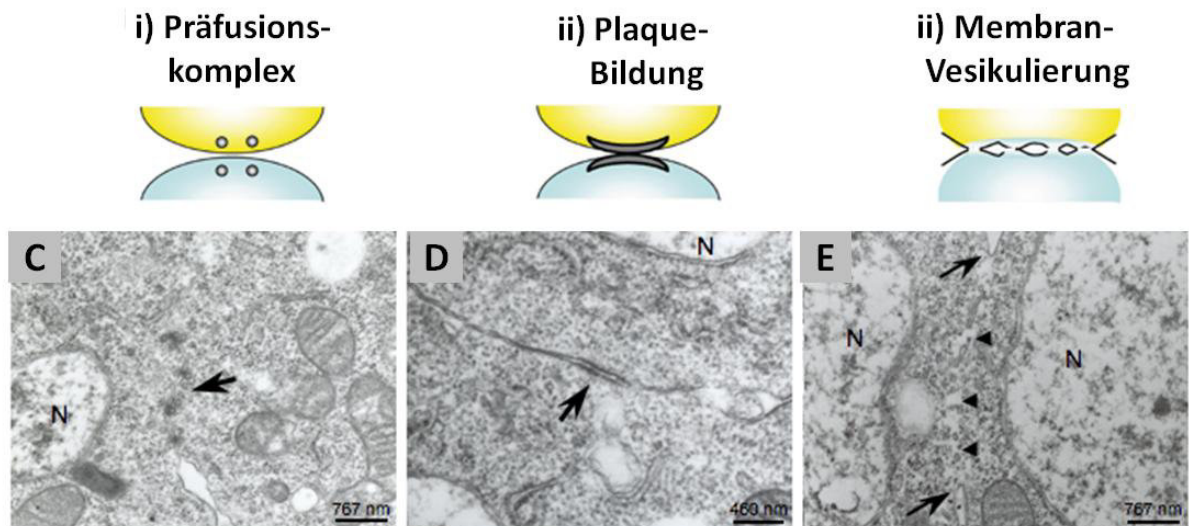


Abb. 2.2: **Die Myoblastenfusion auf zellulärer und ultrastruktureller Ebene.** A: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte während der Myoblastenfusion auf der zellulären Ebene. Zuerst fusioniert ein fusionskompetenter Myoblast (FCM, gelb) mit einer Founderzelle (FC, blau). Durch die weiteren Fusionsvorgänge erreicht der wachsende Muskel die finale Größe. Duf/Kirre (a) und SNS (b) akkumulieren an der Zellkontaktstelle in fusionierenden Myoblasten (siehe 2.4). Antikörperfärbungen an *Drosophila* Embryonen im Stadium 15 zeigen die ringförmige Lokalisation von Duf/Kirre (a) und SNS (b) an der Kontaktstelle der FCM (gelb nachgezeichnet) und Myotube. B: Schematische Darstellung der auf ultrastruktureller Ebene beobachteten Fusionsereignisse. Die elektronendichten Vesikel akkumulieren zunächst auf beiden Seiten der gegenüberliegenden Membranen und

2. EINLEITUNG

bilden einen Präfusionskomplex (i). Im weiteren Verlauf werden elektronendichte Plaques gebildet (ii). Schließlich führt die Bildung von zahlreichen kleinen Fusionsporen zu einem Zusammenbruch der Membranen und der zytoplasmatischen Kontinuität (iii). C-E: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der, während der zweiten temporalen Phase beobachteten, elektronendichten Strukturen in wildtypischen (C-D) und *wasp*^{3D3-035} mutanten (E) Embryonen. Die Pfeile markieren den Präfusionskomplex (C) und später die elektronendichten Plaques (D), während die Pfeilköpfe (E) die Bildung der Fusionsporen andeuten. N: Nukleus (Abgeändert nach Kesper *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2008; Önel *et al.*, 2009).

2.4 Das transiente Signalzentrum, FuRMAS, ähnelt der Immunologischen Synapse und spielt eine zentrale Rolle bei der Verbindung der Zelladhäsion und der lokalen F-Aktin-Akkumulation mit den dynamischen Fusionsvorgängen während der Myoblastenfusion

Genetische Studien haben zahlreich fusionsrelevante Proteine identifiziert, die an der Kontaktstelle zwischen FCs und FCMs akkumulieren. Das Initiieren der heterologen Zellerkennung und Adhäsion wird durch die Transmembranrezeptoren der Immunoglobulin-Superfamilie (IgSF) gewährleistet. Dumbfounded/Kin of Irre (Duf/Kirre) ermöglicht in FCs und wachsenden Myotuben die chemoattraktive Adhärenz der FCMs (Abb. 2.2, A, a) und agiert in Redundanz mit Roughest/Irregular chiasma C (Rst/IrreC) (Ruiz-Gomez *et al.*, 2000, Stünkelnberg *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu Duf/Kirre ist Rst/IrreC in beiden Zelltypen exprimiert. Auf der gegenüberliegenden Seite der FCMs wird die heterotypische Adhäsion durch das Transmembranprotein Sticks and Stones (Sns) vermittelt (Abb. 2.2, A, b) (Bour *et al.*, 2000; Galetta *et al.*, 2004). Das Sns paraloge Protein Hibris (Hbs), welches ebenfalls in FCMs exprimiert wird, kann partiell redundant agieren, scheint jedoch nicht essentiell für die Myoblastenfusion zu sein (Shelton *et al.*, 2009). Denn im Gegensatz zu den anderen Transmembranproteinen führt dessen Funktionsverlust zu einem nur sehr milden Fusionsphänotyp, was eine antagonistische oder redundante Funktion mit Sns annehmen lässt (Artero *et al.*, 2001; Dworak *et al.*, 2001). Für die adhäsionsvermittelnden Moleküle Duf/Kirre, Rst/IrreC und Sns konnte gezeigt werden, dass diese sich in einer ringförmigen Struktur an der Kontaktstelle anordnen, sodass ein multipler Proteinkomplex an den Zellkontaktseiten postuliert wird (Kesper *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2007) (Abb. 2.3, A). Dieser Proteinkomplex trägt den Namen FuRMAS (Fusion-Restricted Myogenic-Adhesive Structure) und fungiert als Signalzentrum für rekrutierte, fusionsrelevante Proteine (Abb. 2.2, A, a und b; Abb. 2.3, B). Nach der erfolgreichen Adhäsion kommt es zur Akkumulation des F-Aktins und dessen regulatorischen Proteinen im Zentrum dieser Struktur, was als Aktin-Plaque oder Aktin-Fokus bezeichnet wird (Kesper *et al.*, 2007) (Abb. 2.3, A). Interessanterweise ähneln die FuRMAS in ihren Eigenschaften anderen transienten Membran-assoziierten Strukturen, wie der Immunologischen Synapse, Podosomen und Invadopodien. Diese sind ebenfalls durch einen Ring aus Adhäsionsmolekülen in

2. EINLEITUNG

Zusammenhang mit lokaler F-Aktin-Akkumulation charakterisiert (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Die Annahme wird zusätzlich durch die kürzlich durchgeführten ultrastrukturellen Analysen unterstützt. Diese zeigten Podosomen-ähnliche Strukturen, die von den FCMs ausgehend in die FCs oder wachsende Myotuben hineinragen (Sens *et al.*, 2010).

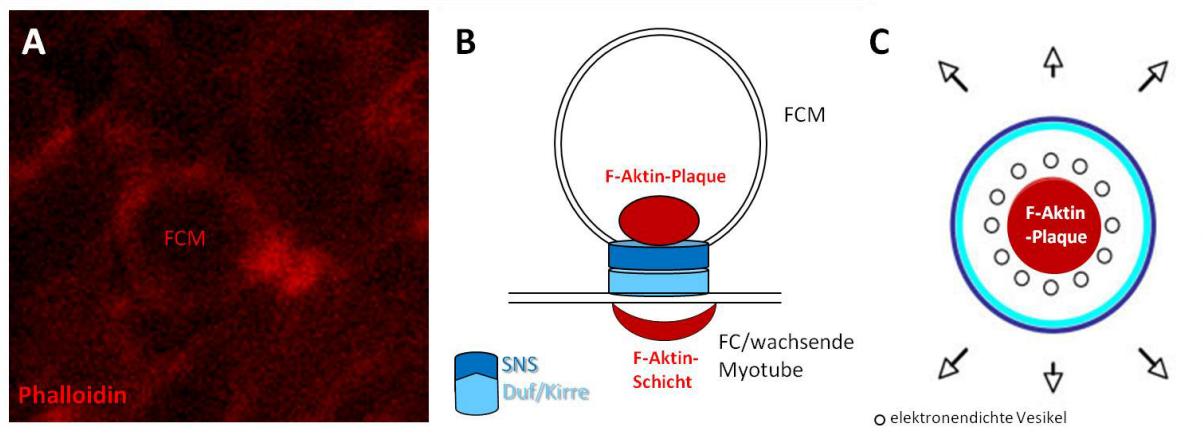


Abb. 2.3: Zelladhäsion und Ausbildung von FuRMAS an der Kontaktstelle der fusionierenden Myoblasten.
A: Histologische Färbung der F-Aktin-Strukturen mittels Phalloidin. Die Akkumulation des Aktin-Plaques, der im Zentrum der FuRMAS lokalisiert, ist sichtbar. B: Schematische, laterale Ansicht der Zelladhäsion mit den Transmembranproteinen Duf/Kirre (hellblau) und Sns (dunkelblau), die einen Adhäsionsring formen. C: Durchschnittsansicht der FuRMAS. Die Weitung des Aktin-Plaques auf der Seite der FCMs, der aus den verzweigten Aktinfilamenten besteht, bedingt die Expansion der FuRMAS. Elektronendichte Vesikel akkumulieren an den gegenüberliegenden Membranen (Abgeändert nach Önel und Renkawitz, 2009).

Während der Fusion halten die adhäsiven Strukturen die Membranen eng zusammen. Dabei dehnen sich die Aktin-Plaques, was vermutlich die Expansion der FuRMAS bedingt und die Integration der FCMs nach sich zieht (Abb. 2.3, C). In fixierten Präparaten sowie in Zeitrafferaufnahmen von *Drosophila* Embryonen konnte eine besondere Dynamik dieser Strukturen beobachtet werden, die innerhalb kurzer Zeit im Durchmesser von 1 bis 5 μm expandierten (Önel und Renkawitz-Pohl, 2009). Die Bildung der zentralliegenden Aktin-Plaques ist meist innerhalb von 2 Minuten abgeschlossen, die Auflösung bereits nach weniger als einer Minute. Dabei variieren die Plaques ebenfalls in ihrer Größe und können einen Durchmesser von bis zu 4,5 μm erreichen (Richardson *et al.*, 2007). Diese Dynamik erfordert eine strenge Regulation der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation und Depolymerisation während der Myoblastenfusion. Des Weiteren ist eine geregelte Signalübertragung von den Zell-Adhäsionsmolekülen an das Aktin-Zytoskelett von enormer Bedeutung.

2.5 Die Regulation der Aktin-Polymerisation an der Kontaktstelle der Myoblasten während eines Fusionsvorgangs

Letzte Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass der Aktin-Plaue nur auf der Seite der FCMs gebildet wird, während lediglich eine dünne F-Aktin Schicht in FCs/wachsenden Myotuben generiert wird (Sens *et al.*, 2010). Der transiente F-Aktin-Plaue, ist ein bedeutendes Charakteristikum der FuRMAS und ist äußerst wichtig für die erfolgreiche Myoblastenfusion in *Drosophila* (Schröter *et al.*, 2004, Kesper *et al.*, 2007). Dabei wird die dynamische Selbstassemblierung des 42 kDa großen, monomeren globulären Aktin (G-Aktin), zu filamentösen Aktins (F-Aktins) streng durch zahlreiche Aktin-bindende Proteinen kontrolliert (Chhabra *et al.*, 2007). Der hochkonservierte Hauptnukleator, das Actin-related-protein 2/3 (Arp2/3)-Komplex, ist in der Lage an bereits existierende Filamente zu binden und Assemblierung neuer, 70°-verzweigter Tochterfilamente zu initiieren (Pollard, 2007). Der Arp2/3-Komplex wird seinerseits durch die kernbildungsfördernde Faktoren (nucleation promoting factors, NPFs) der Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (Wasp)-Familie aktiviert. Derzeit sind zwei NPFs, Scar/Wave (Berger *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2007) und Wasp (Gildor *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Schäfer *et al.*, 2007), bekannt, die die regulatorische Funktion des Arp2/3-Komplexes in der Myoblastenfusion übernehmen. Die Stimulation des Arp2/3-Komplexes erfolgt durch drei C-terminale, evolutionär konservierte, kurze Motive, die so genannten VCA-Module. Während das VC-Motiv mit Aktin interagiert, bindet das CA-Motiv an den Arp2/3-Komplex und bewirkt dessen Konformationsänderung (Robinson *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den Wirbeltieren, die zwei Wasp und drei Scar Proteine besitzen, kodiert das Genom der Fruchtfliege nur für ein einziges *wasp* und *scar* Gen (Zallen *et al.*, 2002; Tal *et al.*, 2002). Da beide Proteine maternal transkribiert werden, erzeugen die homozygoten Mutanten zunächst nur einen leichten Fusionsphänotyp; dieser wird jedoch deutlich verstärkt, wenn sowohl die maternale, als auch die zygotische Proteinaktivität nicht mehr vorhanden ist (Kim *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2007; Massarwa *et al.*, 2007). Durch die intramolekularen Interaktionen liegt Wasp autoinhibiert vor und kann beispielsweise durch die Rho-Familie-GTPase Cdc42 reaktiviert werden (Pollard, 2007). Des Weiteren basiert der Wasp-abhängige Regulationsweg auf der Interaktion mit dem Wasp-interacting protein (Wip)/Verpolin1 (Vrp1). Dieser wird an die Fusionsstelle rekrutiert, wo es zu einer physikalischen Bindung der N-terminalen Wasp-Homology 2 (WH2)-Domäne und der C-terminalen Wip/Vrp1-Wasp-bindenden Domäne (WBD) kommt (Kim *et al.*, 2007). Somit fungiert Wip/Vrp1 als ein positiver Wasp-Regulator während der Myoblastenfusion. Im Gegensatz zu der gut untersuchten Wip/Vrp1-Wasp-abhängigen Aktin-Polymerisation ist der zweite Aktin-regulatorische Signalweg, der durch Scar/Wave vermittelt wird, nur wenig charakterisiert und soll in dieser Arbeit im Fokus stehen. Dieses Protein wird im Gegensatz

zu Wasp nicht autoinhibiert, bildet jedoch während der Neurogenese von *Drosophila* einen pentameren Komplex mit Kette, Sra1, Abi und Brk1 (Bogdan und Klämbt, 2003; Schenck *et al.*, 2004) (Abb. 2.4). Die Aktivierung des Komplexes erfolgt durch die Rac GTPasen. Bisher konnte nur Kette eine Rolle während der Myoblastenfusion zugewiesen werden, die weiteren Komplexkomponenten bedürfen zusätzlicher Analysen. Parallel zur Arp2/3-basierten Myoblastenfusion wurde kürzlich ein anderer Signalweg, der die p21-aktivierte Kinasen (PAKs) involviert, aufgedeckt (Duan *et al.*, 2012). Hier konnte postuliert werden, dass die partiell redundant wirkenden DPak1 und DPak3 stromabwärts von der Rac (siehe 2.8) agieren und somit direkt den Fusionsvorgang fördern.

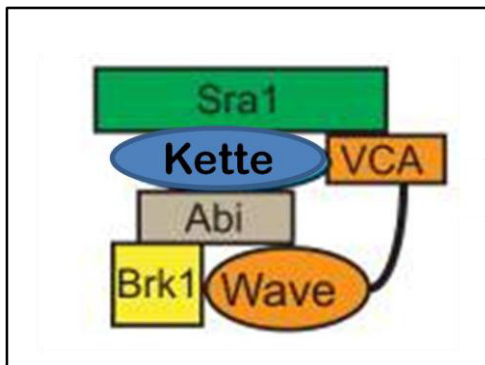


Abb. 2.4: **Schematische Darstellung des pentameren Scar-Komplexes.** In dem hier dargestellte inaktivierten Zustand des Scar-Komplexes ist die VCA-Domäne blockiert und wird erst nach der Aktivierung freigelassen, wodurch die Bindung an den Arp2/3-Komplex gewährleistet wird (Abgeändert nach Abmayr und Pavlath, 2012).

An dieser Stelle ist es interessant, wie die Signalweiterleitung von der IgSF-Transmembranprotein-vermittelten Zellerkennung und Adhäsion an die Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisation erfolgt, was im nächsten Abschnitt (2.6) eingeführt wird.

2.6 Das SH2-SH3 Adaptorprotein Dreadlock vermittelt in beiden Zelltypen die Arp2/3-basierte Aktin-Polymerisation während der Myoblastenfusion

Die Myoblastenfusion in *Drosophila* wird durch die heterologe Zelladhäsion, basierend auf IgSF-Transmembranproteinen, eingeleitet. Diese vorangehende Zellerkennung ist die Voraussetzung für die F-Aktin-Formierung. Es existieren zahlreiche Signalwege, wie die IgSF-vermittelte Zelladhäsion mit der Arp2/3-abhängigen Polymerisation verknüpft wird. Das bisher bekannte SH2-SH3 Adaptorprotein Crooked setae (Crk) konnte als FCM-spezifisches Linkerprotein identifiziert werden, da es in *Drosophila* S2-Zellkultur einerseits an die intrazelluläre Domäne von Sns bindet, andererseits an den Wasp-Interaktionspartner, Vrp1/Wip (Galetta *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2007). Kürzlich konnte Dreadlock (Dock), ein weiteres SH2-SH3-Protein charakterisiert werden, welches in beiden Zelltypen eine vermittelnde Rolle übernimmt (Kaipa *et al.*, 2013).

Die Zelladhäsionsmoleküle Duf/Kirre und Rst/IrreC zeigen eine 33%-tige Übereinstimmung mit den humanen NEPH1 und Nephrin, während Sns und Hbs zu 28% mit diesen Proteinen identisch sind (Gerke *et al.*, 2003). Nephrine sind strukturelle Komponenten der Schlitzmembran, die zwischen den Fortsätzen der Podozyten ausgebildet wird und für die Blutfiltration in der Niere essentiell ist (Welsh und Saleem, 2010). Zusammen mit dem Kapillarendothel und der dazwischenliegenden Basalmembran umgeben die Podozyten die Nierenkörperchen und sind für die richtige Funktion der sogenannten Blut-Harn-Schranke verantwortlich. Eine weitere Aufgabe der 180 kDa großen Transmembranproteine, ist die Rekrutierung der, für die Aufrechterhaltung der richtigen Struktur, wichtigen Proteine an die zytoplasmatische Seite der Podozytenfüßchen (Benzing, 2004). Entsprechend dieser signalübertragenden Rolle, interagieren Nephrine *in vivo* mit den Kinasen der Src-Proteinfamilie und werden dadurch am intrazellulären Ende Tyrosin-phosphoryliert (Li *et al.*, 2004). Interessanterweise liegen die zytoplasmatischen Tyrosinmotive innerhalb der Binderegion der Src-homologen 2 (SH2) Domäne des Adaptorproteins Nck. Das Nck-Protein hat drei SH3-Domänen und eine C-terminale SH2-Domäne; während die SH2-Domäne an die phosphorylierten YDxV Bereiche des Nephrins bindet, interagieren die SH3-Domänen mit verschiedenen Effektorproteinen, die für die Organisation des Zytosketts verantwortlich sind. Dazu gehören unter anderen das Arp2/3-Komplex stimulierende N-Wasp, sowie die Proteinkinase Pak (Buday *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006). Letzte Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass das *Drosophila* Nck-homologe Protein, Dock, für die Myoblastenfusion benötigt wird (Kaipa *et al.*, 2013). Das in beiden Zelltypen exprimierte Protein interagiert auf genetischer und biochemischer Ebene mit den Arp2/3- Aktivatoren, Scar/Wave, Wasp und Vpr1/Wip. Weitere Faktoren sind an dem Übergangsprozess von monomerem zum filamentösen Aktin beteiligt. So wird im Rahmen dieser Arbeit das Aktinmonomer-bindende Protein Chickadee/Profilin untersucht, das im nächsten Punkt eingeführt wird.

2.7 Die Regulation der Myoblastenfusion durch Aktinmonomer-bindende Proteine: Profilin

Ein Aktin-Filament besitzt einen Plus- und einen Minusende. Dabei erfolgt die Anlagerung des ATP-Aktins an das schnell-wachsende Plusende, wo ATP zu ADP durch Abspaltung eines Phosphatrests hydrolysiert wird. Diese Hydrolyse läuft am Minusende schneller ab als die Anlagerung eines neuen ATP-Aktins und bewirkt eine Dissoziation des ADP-Aktins (Pollard, 2007).

Die Bildung der Aktin-Plaques an der Seite der fusionierenden Myoblasten ist ein dynamischer Vorgang. Diese erreichen innerhalb von zwei Minuten eine Größe von 4,5 µm und lösen sich in Kürze wieder auf (Richardson *et al.*, 2007). Um den Mechanismus der Plaque-Formierung zu analysieren ist es zunächst notwendig den Prozess der Aktin-

Polymerisierung und Depolymerisierung zu verstehen. Aktin-Polymerisierung basiert auf klassischer Selbstassemblierung, die auf zellulärer Ebene durch eine Gruppe von Proteinen reguliert wird. Somit wird die Nukleation der neuen Aktin-Filamente primär durch den Arp2/3-Komplex, der die verzweigten Filamente produziert, sowie durch Formine und Spire, die die unverzweigten Filamente formen, initiiert. Darüber hinaus existieren Aktinmonomer-bindende Proteine, die den direkten Nukleotidaustausch an Aktinmonomeren gewährleisten und die Elongation des Filaments steuern. Zurzeit sind sechs derartige Proteine bekannt, die von der Hefe bis zu den Wirbeltieren konserviert sind: Profilin, ADF/Cofilin, Twinfilin, Srv2/CAP, Wasp/Wave und Vrp1/Wip (Paavilainen *et al.*, 2004). Dabei fördert Profilin, zusammen mit den Komponenten des Arp2/3-Komplexes, die Aktin-Polymerisation, indem es den ADP-ATP Nukleotid-Austausch katalysiert (Mockrin und Korn, 1980). In *Drosophila* ist das Profilin-orthologe Gen *chickadee* (*chic*) in zahlreichen Aktin-basierten Prozessen involviert, wie beispielsweise während der Spermatogenese (Castrillon *et al.*, 1993), der Oogenese oder der Borstenbildung (Verheyen und Cooley, 1994). Zusätzlich ist es an Zellmigrationsvorgängen, wie den epithelialen Dorsalschluss (Jasper *et al.*, 2001), axonalen Transport (Kim *et al.*, 2003) und larvalen Wundschließung (Brock *et al.*, 2012), beteiligt. Außerdem konnte in Zellkulturexperimenten an vertebraten Zellen gezeigt werden, dass Profilin die Aktinpolymerisation unterstützt, indem es an die Prolin-reiche Region von Wasp, Scar/Wave und den Forminen bindet, die ebenfalls die Aktinpolymerisation vorantreiben (Karlson und Lindberg, 2008). Während die Wasp-abhängige Aktin-Polymerisation FCM-spezifisch zu sein scheint, ist die Scar/Wave-basierte Aktin-Assemblierung in beiden Myoblastenpopulation von Bedeutung (Sens *et al.*, 2010). Daher ist die Regulation der Aktivierung des pentameren Scar-Komplexes ein weiterer interessanter Aspekt, der während der Bildung und Auflösung der Aktin-Plaques relevant ist.

2.8 Die Rho-GTPase Rac kontrolliert die Regulation des Scar-Komplexes und fördert somit die Assemblierung des F-Aktins an den kontaktierenden Myoblastenmembranen

Rho-GTPasen sind in zahlreiche zelluläre Prozesse, einschließlich der Reorganisation des Zytoskeletts, Zelltransformation, Induktion der DNA-Synthese, axonaler Transport und Zellmigration, involviert. Diese evolutionär konservierten Proteine entfalten ihre Funktion, indem sie in ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form die stromabwärts liegenden Zielproteine, wie die Aktin-Nukleatoren, Proteinkinasen oder Phospholipasen, stimulieren (Jaffe und Hall, 2005; Heasman und Ridley, 2008). Die Aktivierung der Rho-GTPasen erfolgt durch GEFs, die das Ablösen der GDPs und die Bindung der GTPs fördern (Rossman *et al.*, 2005). Andererseits inaktivieren GAPs durch die intrinsische Aktivität die Rho-GTPasen (Van Aelst und D'Souza-Schorey, 1997). Die dominant-negativen Mutanten beinhalten an der Position

17 einen Aminosäureaustausch von Threonin nach Aspargin (T17N). Diese Mutation stört zwar die GEF-Bindung nicht, inhibiert aber die Interaktion mit den stromabwärtsliegenden Effektorproteinen (Feig, 1999). Die konstitutiv-aktiven Mutanten sind dagegen nicht in der Lage GTP zu hydrolysieren, was eine konstitutive Signalübertragung an die Effektorproteine bewirkt. Der gängige Aminosäureaustausch findet an der Position 12 statt, wo Glycin gegen Valin ausgetauscht wird (G12V) (Wang *et al.*, 2007). *Drosophila* besitzt drei Rho-GTPasen: RhoA, Cdc42 und Rac. Untersuchungen an konstitutiv aktiven und dominant-negativen Mutanten zeigen, dass Rac an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität, in die Kontrolle des axonalen Wachstums sowie während des Dorsalschuss und der Myoblastenfusion, involviert ist (Harden *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1994; Kaufmann *et al.*, 1998). Weiterhin kodiert das *Drosophila* Genom für drei *rac*-Gene mit überlappenden Funktionen: *rac1*, *rac2* und *mtl*. Diese Gene sind während der Embryonalentwicklung zwar ubiquitär exprimiert, jedoch scheinen nur *rac1* und *rac2* eine Rolle während der Myoblastenfusion zu spielen. Dies basiert zum Einen auf den phänotypischen Studien der *racV12*- und *racN17*- Mutanten, bei welchen die Fusion der Myoblasten bei einer Mesoderm-spezifischen Überexpression vollständig blockiert ist (Abb. 2.5, C-D). Zum Anderen findet die Fusion sowohl in den *rac1*, *rac2*- Doppelmutanten, als auch in *rac1*, *rac2*, *mtl*- Tripelmutanten entweder nicht oder nur im geringen Maße statt (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002) (Abb. 2.5, B). Die bisherigen Studien beziehen sich auf Rac1, während die Funktion von Rac2 noch weitgehend unerforscht ist.

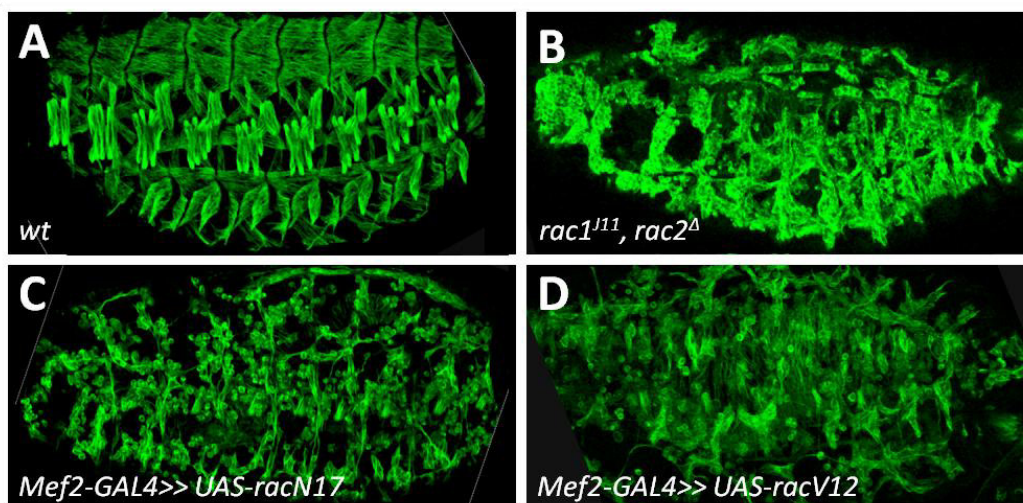


Abb. 2.5: **Phänotypische Analyse der *rac1*, *rac2*- Doppelmutanten, sowie *rac1*-Überexpressionsmutanten machen deutliche Störungen der Myoblastenfusion sichtbar.** A-D: Histologische Färbung an der Muskulatur von *Drosophila* Embryonen mittels β 3-Tubulin. Die dargestellten Embryonen befinden sich im 16-ten Entwicklungsstadium. A: wildtypische Muskulatur. B: *rac1*^{J11}, *rac2*^Δ- Nullmutanten zeigen nur wenige Fusionsereignisse, was auf die maternal übertragenen Genprodukte zurückzuführen ist. C-D: Mesoderm-spezifische induzierte Expression der *racV12* und *racN17*- Mutanten führt zu einem vollständigen Stopp der Myoblastenfusion.

Auf der Suche nach Rac1-Aktivatoren, die in den Prozess der Myoblastenfusion involviert sind, wurde ein putativer nicht-konventioneller GTP-Austauschfaktor (Guanosine triphosphate Exchange Factor, GEF), Myoblast City (Mbc), identifiziert (Rushton *et al.*, 1995). Dieser spielt eine fundamentale Rolle in den FCMs, wo es vermutlich zusammen mit Elmo Rac1 aktiviert (Haralalka *et al.*, 2011). Das in Vertebraten vorkommende, Mbc orthologe Protein Dock180 bildet zusammen mit Elmo ein Komplex, der ebenfalls für die Aktivierung von Rac1 zuständig ist. Dabei erfolgt die Rekrutierung des Komplexes an die Ig-Transmembranrezeptorproteine über kleine SH2-SH3-Adaptorproteine, wie Crk (Cote und Vuori, 2007; Geisbrecht *et al.*, 2008; Albert *et al.*, 2000). Dagegen scheint das Mbc in *Drosophila* unabhängig von Crk zu agieren (Balagopalan *et al.*, 2006). Für Rac1 selbst wird postuliert, dass es entweder, wie Mbc, nur in den FCMs an der Formierung von Aktin-Plaques beteiligt ist, oder in beiden Zelltypen aktiv ist, während die Aktivierung in FCs durch ein anderes GEF gewährleistet werden muss (Haralalka *et al.*, 2011). Das aktivierte Rac1 bindet an den Scar-Komplex, öffnet die blockierte VCA-Domäne und fördert somit die Arp2/3-abhängige Aktin-Polymerisation (Takenawa und Suetsugu, 2007; Lebensohn und Kirschner, 2009). Die früheren Untersuchungen der Aktin-Plaques in *rac*-Triplemutanten, *kette* und *mbc* Einzelmутanten berichteten von anormalen vergrößerten Plaques, deren Fläche von den wildtypischen $1,9 \mu\text{m}^2$ auf $3,4 \mu\text{m}^2$ expandierte, was eine gestörte Plaque-Auflösung prognostizieren lässt (Richardson *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu zeigten die jüngsten Studien an primärer Myoblastenkultur, dass die Plaques in *mbc*-Mutanten lediglich weniger kompakt und zerstreut sind (Haralalka *et al.*, 2011). Neben der Rac-basierten Rekrutierung von Scar, wird postuliert, dass auch DPaks der Gruppe I, DPak1 und DPak3, die mit den Aktin-Plaques ko-lokalisieren, durch Rac1 an die Fusionsmembranen gebracht werden (Duan *et al.*, 2012). Insgesamt kann postuliert werden, dass die Bildung und Auflösung der F-Aktin-Plaques ein hochregulierter dynamischer Prozess ist, der neben der Aktin-polymerisierenden Proteinen auch depolymerisierende Faktoren benötigt.

2.9 Die Depolymerisation der Aktin-Filamente spielt eine kritische Rolle bei zahlreichen zellulären Aktivitäten und wird durch Aktinmonomer-bindende Proteine Cofilin/Twinstar und Twinfilin reguliert

Die Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts ist ein essentieller Vorgang bei verschiedenen zellulären Bewegungsabläufen, wie der Chemotaxis oder dem axonaler Transport. Neben der Aktin-Polymerisation spielt die Depolymerisation der Filamente eine entscheidende Rolle bei der Initiation der Zellbewegung (Rodriguez *et al.*, 2003; Etienne-Manneville, 2004) und auch bei der Dynamik der, auf Seite der FCMs beobachteten, Aktin-Plaques. Auf ultrastruktureller Ebene der *Drosophila* Myoblastenfusion konnte visualisiert werden, dass es

bei der Auflösung von elektronendichten Plaques zur Membranvesikulierung kommt (Dobberstein *et al.*, 1997; Massarva *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2008). Weiterhin wurde postuliert, dass die fehlende Vesikulierung in verschiedenen Fusionsmutanten eine Vergrößerung der Aktin-Plaques zur Folge hat, was mit einer gestörten Auflösung begründet wird (Richardson *et al.*, 2007). Somit wurden im Rahmen dieser Arbeit bekannte Aktin-depolymerisierende Proteine, bezüglich deren Funktion bei der Plaque-Auflösung während des Fusionsvorgangs, analysiert. Derzeit sind in Vertebraten und in *Drosophila* die monomerbindende Proteine Cofilin und Twinfilin am besten charakterisiert.

Biochemische Studien haben Cofilin als einen Hauptfaktor der Aktindynamik-fördernden Komponente mit dualer Funktion etabliert. Diese konservierte Proteinfamilie besteht aus sehr kleinen Proteinen (13-19 kDa), die in der Lage sind sowohl an G- als auch an F-Aktin zu binden (Abb. 2.6). Die F-Aktin Bindung induziert eine Drehung der Filamentstruktur, was die Depolymerisation durch Dissoziation des monomeren Aktins am Minusende fördert (Bamburg, 1999; McGough *et al.*, 1997). Gleichzeitig erzeugt Cofilin durch gezieltes Schneiden der Aktin-Filamente mehr freie Enden und stimuliert somit weitere Polymerisationsrunden (Wang *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu den meisten Vertebraten, besitzen die niederen Eukaryoten, wie *Drosophila melanogaster*, nur ein Cofilin-homologes Protein, genannt Twinstar (Tsr) (Bamburg, 1999). Die Depolymerisation der Aktinfilamente durch Tsr am Minusende ist für den axonalen Transport in *Drosophila* von enormer Bedeutung. Während die Inaktivierung von Tsr in Zellen in aberranter F-Aktin-Akkumulation resultiert, erzeugt die Nullmutation des Gens in der Fliege eine Letalität. Zusätzlich weisen die homozygoten Mutanten des hypomorphen *tsr*-Allels sowohl während der Meiose, als auch der Mitose zytokinetische Defekte bei der Migration der Zentrosome auf (Gunsalus *et al.*, 1995; Arber *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2001). Eine wichtige regulatorische Funktion wird dem Protein auch bei der Aktin-basierenden Zellbewegung während der Oogenese sowie bei der Umstrukturierung der Adhäsionsverbindungen, sogenannten Adherens Junctions, während der epithelialen Morphogenese zugeschrieben (Chen *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2012). Die Aktivität des Cofilin/Tsr-Proteins wird mittels des konservierten Prozesses der Phosphorylierung reguliert (Arber *et al.*, 1998). Die Inaktivierung erfolgt durch die Phosphorylierung an der dritten Aminosäure Serin und wird durch die Lim-Kinase (Limk) bewerkstelligt. Die Phosphatase Slingshot (Ssh) reaktiviert das Protein durch die Dephosphorylierung (Niwa *et al.*, 2002). Somit agieren Cofilin/Tsr und das Arp2/3- Komplex zusammen um das Wachstum und die dynamische Reorganisation der Aktin-Filamente zu regulieren.

2. EINLEITUNG

Ein weiteres, konserviertes, ca. 40 kDa großes, Aktinmonomer-bindendes Protein ist Twinfilin (Twf). Die Präsenz dieser Proteinfamilie wurde in zahlreichen Eukaryoten, von Hefen bis zu den Säugetieren, nachgewiesen. Es beinhaltet zwei ADF-H-Domänen, welche den Cofilins homolog sind (Lappalainen *et al.*, 1998). Twf bindet bevorzugt an das ADP-G-Aktin und verhindert *in vitro*, durch den entstandenen Komplex mit G-Aktin, dessen Anlagerung an die Filamente (Goode *et al.*, 1998; Palmgren *et al.*, 2001). Zudem konnte in knospenden Hefezellen gezeigt werden, dass es auch direkt mit Aktin-Filamenten interagieren und somit eine Fragmentierung der Filamente begünstigen kann (Moseley *et al.*, 2006). Das *Drosophila* Genom kodiert für nur ein Twf Homolog (Wahlström *et al.*, 2001). Eine hypomorphe Mutation des Gens hat zahlreiche morphologische und entwicklungsorientierte Defekte zur Folge. Neben dem Verlust der Flugfähigkeit kommt es zu einer anormalen Borstenmorphologie, wodurch eine Involvierung des Proteins in die Aktin-basierten Entwicklungsprozesse der Fruchtfliege angenommen wird. Die mittels P-Element Mutagenese, hergestellten Stämme, *twf¹⁰²* und *twf¹¹⁰*, sind larval letal mit nur wenigen adulten „Escapers“. In *Drosophila* konnte eine Funktion während der Oogenese, des axonalen Transports sowie bei der präsynaptischen Endozytose an neuromuskulären Synapsen gezeigt werden (Wang *et al.*, 2010). Eine zusätzliche Besonderheit ist die genetische Interaktion mit Cofilin, sowie die antagonistische Funktion mit Profilin/Chic während der Borstenmorphogenese (Wahlström *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2010). Zusammenfassend indizieren die bisherigen Daten eine fundamentale Rolle von Twinfilin bei der negativen Regulation der Aktin-Dynamik in vielzelligen Organismen, da eine Mutation des Gens eine unkontrollierte Aktin-Assemblierung zur Folge hat.

2.10 Das Aip1 homologe Flare-Protein reguliert zusammen mit Cofilin/Twinstar die Disassemblierung des F-Aktins um die Dynamik des Aktin- Zytoskeletts aufrecht zu erhalten

Die Umstrukturierung und die zügige Depolymerisierung der Aktin-Filamente sind entscheidend für zahlreiche zelluläre Aktivitäten. Neben der Aktindynamik-fördernden Hauptkomponente, Cofilin/Tsr, existieren weitere Moleküle, die zusammen mit Cofilin/Twinstar die Disassemblierung der Filamente vorantreiben (Bamburg, 1999; Ono, 2007). Ein gut untersuchter Kofaktor ist das hochkonservierte Protein Aip1 (Actin interacting protein 1), welchem in Modelorganismen eine relevante Rolle bei den Aktin-basierten Prozessen zugeschrieben wird. Charakteristisch für die Proteinstruktur sind die 14 WD40 Domänen, die einen zirkulären β -Propeller, bestehend aus sieben im Kreis angeordneten Flügeln, formen. In genetischen und biochemischen Studien konnte beobachtet werden, das Aip1 in der Lage ist, gleichzeitig an Aktin und Cofilin zu binden und die Drehung des Aktin-Filaments, durch die Erleichterung der Trennungseigenschaft und die Bedeckung der freien

2. EINLEITUNG

generierten Filamentenden, zu fördern (Balcer *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2002) (Abb. 2.6). In *C. elegans* ist das Aip1 homologes Protein UNC-78 in der Muskulatur exprimiert, während die Nullmutation des Genes eine Desorganisation des muskulären Aktins, sowie Kontraktionsdefekte zur Folge hat (Ono, 2001). Zudem konnte kürzlich eine Ko-Lokalisation mit Cofilin an dem führenden Ende der migrierenden Fibroblasten und an den kortikalen Aktin Patches in Hefezellen nachgewiesen werden (Tsuji *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010). An dem einzigen *Drosophila* Aip1 homologen Gen, welches den Namen *flare* (*flr*) trägt, wurden bisher nur wenige funktionelle Analysen durchgeführt. Das Gen wurde jedoch bereits in einem Screen, im welchem nach Mutationen der Flügelhaare gesucht wurde, entdeckt und seitdem als Marker in zahlreichen Studien verwendet (Garcia-Bellido und Dapena, 1974). Unter Verwendung der *Drosophila* S2 Zellen konnte zunächst in einem RNAi-Versuch eine essentielle Rolle des Proteins bei der Ausbildung der Lammelipodia aufgedeckt werden (Rogers *et al.*, 2003). Im Jahr 2007 konnte in Ren *et al.* gezeigt werden, dass die letale *flr*-Punktmutation in pupalen Epidermiszellen eine erhöhte F-Aktin Akkumulation und Stabilität ergibt. Ferner erscheint in diesem Gewebe der *flr*-Phänotyp ähnlich dem, der *tsr* mutierten Zellen, sodass postuliert wird, dass beide Proteine bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts in der Fliegenepidermis zusammenwirken. Systematische genetische Analyse der Morphogenese und der Funktion der Muskeln unter Verwendung von RNAi-Bibliotheken veranschaulichen, dass die Larven der *flr*-RNAi-Linie eine gestörte Sarkomerorganisation sowie lange irreguläre Aggregate der Z-Linien aufweisen (Schnorrer *et al.*, 2010).

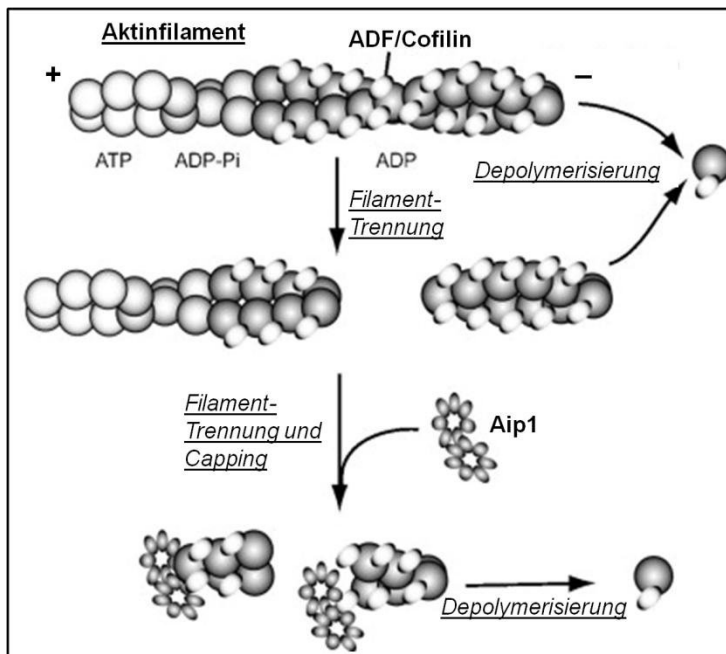


Abb. 2.6: **Schematische Darstellung der Aktin-Depolymerisierung mit dem Fokus auf Cofilin und Aip1.** Während an dem schnell wachsenden Plusende ATP-Aktin angelagert wird, erfolgt am Minusende die Dissoziation des ADP-Aktins durch depolymerisierungsfördernde Faktoren. ADF/Cofilin begünstigt diesen

2. EINLEITUNG

Vorgang einerseits durch Abspaltung der Aktinmonomere, andererseits durch die direkte Trennung der Filamente. Der Kofaktor Aip1 agiert an der Seite des Cofilins um dessen filamenttrennende Eigenschaft zu verbessern. Weiterhin lagert es sich an die freien Plusenden um zusätzlich weitere Runden der Polymerisation zu verhindern (Abgeändert nach Ono, 2007).

Die Untersuchung der Funktion von Aktin-depolymerisierender Faktoren, wie Tsr oder Flr bei der Plaque-Auflösung auf der FCM-Seite ist Bestandteil dieser Arbeit. Bezüglich der Wirkung von *flr* in *Drosophila* ist bisher nur wenig bekannt. Demzufolge wurde die Funktion von Flr auch in der Muskulatur der männlichen Reproduktionsorgane analysiert. Diese wird im Folgenden eingeführt.

2.11 Die Entwicklung der mononukleären und multinukleären Muskeln, die die männlichen adulten Reproduktionsorgane ummanteln

Die Entstehung und Umstrukturierung von adulten Organen und den umliegenden Geweben, einschließlich der Entwicklung des männlichen Reproduktionssystems ist ein komplexer Vorgang. Bereits im Embryo werden Imaginalscheiben angelegt, die sich im Laufe der Metamorphose zu Flügeln, Beinen, Augen, Antennen und Geschlechtsorganen entwickeln. Dabei bildet die einzige, im hinteren Bereich der Larve liegende Genitalscheibe die somatischen Teile der internen männlichen Gonaden: Paragonien, Samenblase, Ductus ejaculatorius und Spermienpumpe während die Gonaden selbst die Testes, in welchen die Spermatogenese stattfindet, formen (Estrada *et al.*, 2003) (Abb. 2.7, A). Die Muskulatur, die die genannten männlichen Reproduktionsorgane ummantelt, ist in Vergleich zu den anderen adulten Muskeln nur wenig untersucht. Kürzlich konnten drei unterschiedliche Muskeltypen identifiziert werden. Die multinukleären glatten Muskelfilamente, die den Testis umgeben, wurden in *Drosophila* zum ersten Mal identifiziert (Abb. 2.7, B). Weitere multinukleäre, jedoch gestreifte Muskulatur umgibt die Samenblase und die Spermienpumpe. Dagegen werden die Paragonien und der Ductus ejaculatorius von einkernigen gestreiften Muskelfasern umhüllt (Susic-Jung *et al.*, 2012) (Abb. 2.7, B). Über den Fusionsvorgang dieser Muskeln ist nur wenig bekannt, es wird jedoch angenommen, dass es ähnlich der FC-FCM-Myoblastenfusion, die die somatische Muskulatur formen, ablaufen muss. Denn auch in diesen Geweben konnte die Expression der Mitglieder der IgSF, Sns und Duf, nachgewiesen werden.

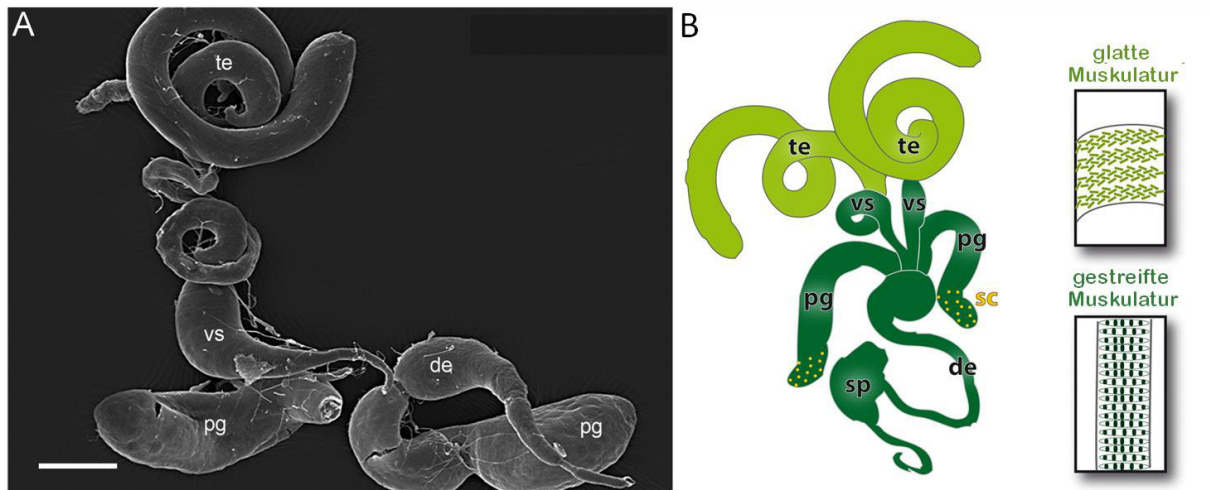


Abb. 2.7: **Das männliche adulte Reproduktionssystem.** A: Übersichtsaufnahme der männlichen Reproduktionsorgane mittels eines Rasterelektronenmikroskops (REM). Maßstabsbalken: 30 μ m. B: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Muskelschichten, die die Reproduktionsorgane umgeben. Die Muskeln mit der zickzackartigen Verteilung der Sarkomere, die der glatten Muskulatur der Vertebraten ähneln, umgeben die Testis (hellgrün). Die gestreiften Muskeln, wie sie in anderen charakterisierten *Drosophila* Muskeln vorkommen, umgeben die übrigen dargestellten Organe (dunkelgrün). Die gelben Punkte markieren die sekretorischen Zellen (sc). A-B: Sichtbar sind Testis (te), Paragonien (pg), Ductus ejaculatorius (de), Samenblase (vs) und Spermienpumpe (sp) (Abgeändert nach Susic-Jung *et al.*, 2012).

3. Zielsetzung der Arbeit

Bisherige Studien demonstrieren die Präsenz kurzlebiger transienter F-Aktin-Plaques, die vor jedem Fusionsereignis an der Kontaktstelle auf der Seite der FCMs gebildet und anschließend aufgelöst werden (Schröter *et al.*, 2004, Kesper *et al.*, 2007; Sens *et al.*, 2010). Um die Bedeutung der Aktin-Polymerisation und Depolymerisation während des Fusionsprozesses in *Drosophila* zu analysieren, werden in dieser Arbeit vier Ansätze verfolgt. Zum Einen gilt es zu verstehen, wie die Oberflächenrezeptoren mit der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation verknüpft sind. Hierbei soll das SH2-SH3-Adaptorprotein Nck/Dock, das als eine Brücke zwischen der Zelladhäsion und der Aktin-Polymerisation fungieren kann, untersucht werden (Kaipa *et al.*, 2013). Da in dieser Arbeit auf die Aktin-Strukturen fokussiert werden soll, sollen die stark fusionsgestörten *dock, vrp1*-Doppelmutanten in Bezug auf das Vorhandensein von Aktin-Plaques analysiert werden. Zum Anderen soll die Rolle weiterer aktinregulatorischer Komponente, wie die des Monomer-bindenden Proteins Chic, während der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation geklärt werden. Bereits vor Beginn dieser Arbeit konnte anhand von Doppelmutanten auch in der Muskulatur von *Drosophila* eine genetische Interaktion von *chic* mit *scar* und *wip* nachgewiesen werden (Prof. S.Önel und Dr. V. Groth, unveröffentlicht). In meiner Masterarbeit habe ich zusätzlich *chic;wasp* und *chic;Arp3*- Doppelmutanten generiert, die ebenfalls eine schwache Interaktion annehmen lassen. Um diesen Bezug näher zu charakterisieren werden im Rahmen dieser Arbeit Dosisexperimente durchgeführt.

Da über die Scar/Wave-induzierte Aktin-Polymerisation während der Myoblastenfusion bisher nur wenig bekannt ist, wird im weiteren Teil dieser Arbeit auf die Funktion der postulierten Scar-Komplex regulierenden Rho GTPasen, Rac1 und Rac2, eingegangen. Während über die Funktion von Rac1 relativ viel bekannt ist, weiß man über eine mögliche Beteiligung von Rac2 an der Myoblastenfusion nur wenig. Deshalb soll im Rahmen dieser Arbeit ein Hefe-2-Hybrid-Screen für beide aktivierte Proteine durchgeführt werden um mögliche Inaktivatoren zu ermitteln, die in beiden Myoblastenpopulationen involviert sind. Basierend auf den letzten Forschungsergebnissen ist Rac1 in der Lage die Fusionsstörungen der *rac1, rac2*-Doppelmutanten vollständig zu retten (Haralalka *et al.*, 2011). So soll analysiert werden, inwiefern Rac2 ebenfalls eine Mesoderm-spezifische Rettung erzeugen kann. Des Weiteren soll versucht werden den Phänotyp der Doppelmutanten mittels einer gewebespezifischen Expression mit Komponenten des Scar-Komplexes, Sra1, zu retten. Diese Experimente geben weitere Informationen, wie die Racs mit der Scar-Komplex-basierten Arp2/3-Aktivierung zusammenwirken.

3. ZIELSETZUNG

Im letzten Teil dieser Arbeit soll die Rolle der Aktin-depolymerisierenden Faktoren bei der Plaque-Auflösung untersucht werden. Neben dem bekannten Haupt-Depolymerisationsfaktor Cofilin/Twinstar, agiert Aip1/Flare in zahlreichen Modellorganismen als ein Kofaktor. Da es zu Aip1/Flare nur wenig *Drosophila*-bezogene Daten gibt, sollen die Expression der mRNA sowie die Verteilung des Proteins in embryonalen und adulten Geweben ermittelt werden. Des Weiteren sollen Twinstar und Flare zusammen mit den zusätzlichen bekannten depolymerisierungsfördernden Faktoren bezüglich deren Funktion, anhand der Einzel- und Doppelmutanten phänotypisch analysiert werden.

4. Materialien

4.1 Verwendete Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

Appli Chem, Darmstadt
Boehringer, Mannheim
Fluka, Neu-Ulm
Gibco, Eggenstein
Invitrogen, Karlsruhe
Merck, Darmstadt
Roche, Mannheim
Roth, Karlsruhe
Sarstedt, Nürnberg
Sigma-Aldrich, Steinheim
BD Biosciences, Heidelberg

4.2 Geräte

4.2.1 Mikroskope

Binokular	„Stemi SV6“, Zeiss, Jena
Fluoreszenzmikroskop	„AxioPlan2 mit AxioCam MRm“, Zeiss, Jena
Inverses Mikroskop	„AxioPhot Observer.Z1“, Zeiss, Jena
Konfokales Laser Scan Mikroskop	„TCS SP2“, Leica, Solms
Photomikroskop	„AxioPhot mit AxioCam ICc3“, Zeiss, Jena

4.2.2 Sonstige Geräte

Elektrophoreseapparatur	Werkstatt Universität Marburg
CO ₂ -Inkubator	„HeraCell“, Heraeus Instruments, Hanau
Heizblock	Techne Dri-Block, Werheim
Kühlzentrifuge	„Biofuge fresco“, Heraeus Instruments, Hanau
Megafuge	1OR, Heraeus Instruments, Hanau
Magnet-Kochrührer	Variomag Mono, H+P Labortechnik, München
PCR Maschinen	Personal Cycler, Biometra Göttingen
	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	GPRT 1400A, Greisinger Electron

4. MATERIALIEN

Photometer	Ultraspec3000, Gene-Quant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg
Schüttler	WT-12, Biometra, GFL 3005/3033, Burgwedel
Spannungsquellen	Power Pack 300, Biometra, München
Tischzentrifuge	Biofuge, Heraeus Instruments, Hanau
Transilluminator	UltraLum, Carson, Kalifornien, USA
UV-Crosslinker	UV-Stratalinker. 2400, Stratagene
Vortexiergerät	Rexa 200, Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL 1002, Biometra, Burgwedel und Julabo 7AI, Seelbach

4.3 Verwendete Kits und Sonstiges

Concanavalin A	Sigma, Taufkirchen
Dan Chlorix (Natriumhypochlorid)	Colgate Palmolive, Hamburg
DIG RNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
Hoechst/DAPI	Sigma, Taufkirchen
Epoxidharz- Einbettungskit	Fluka, Neu-Ulm
Fluoromount-G TM	Biozol, Eching
FuGene HD Transfection Kit	Promega, Mannheim
Glasperlen	Sigma, Steinheim
Hybond N-Membran	Amersham, Braunschweig
JETsorb Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
JETstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Mass Ruler DNA-Ladder Mix	#0403; MBI Fermentas, Heidelberg
MATCHMACKER LexA Two-Hybrid System 2	Clontech-Takara Bio Europe
MATCHMACKER LexA Two-Hybrid System 3	Clontech-Takara Bio Europe
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologie, Waldbronn
pENTR TM Directional TOTO [®] Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Transfektin TM Lipid Reagent	Biorad, München
TSA TM Tetramethylrhodamine Tyramide Reagent Pack	Perkin Elmer, Rodgau
Vectastain Elite ABC Standard Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zero Blunt TOPO [®] Cloning [®] Kit	Invitrogen, Karlsruhe

4. MATERIALIEN

4.4 Stocklösungen und Puffer

1%- Agarosegel in TBE	1% (w/v) Ultra Pure Agarose in 1x TBE aufkochen und lösen, nach Abkühlen auf 60°C 2µl/100 ml Ethidiumbromid (Stocklösung 10 mg/ml) zugeben
Ampicillin	100 mg/ml Ampicillin in 70% Ethanol
BCIP/X-Phosphat	50 mg/ml BCIP in 100% DMF
BU-Salze (10x)	70g Na ₂ HPO ₄ , 30g NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0)
Chloramphenicol	34 mg/ml in 70% Ethanol
DAB-Stammlösung	1 Tablette 3,3- Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) in 20 ml PBS aufgelöst
DNA Auftragspuffer (10x)	0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol, 0,9% (w/v) Borsäure, 40% (w/v) Glycerin in TBE
dNTP- Mix	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP
EDTA	0,5 M
Epon	51,5% (w/v) Epon 812, 28% (w/v) Epon Härter DDSA, 19% (w/v) Epon Härter MNA, 1,5% (w/v) Eponbeschleuniger DMP30
Färbepuffer für <i>in situs</i> an adulten Testes	0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl ₂ , 0,1 M Tris, pH 9,5, 1 mM Levamisol, 0,1% Tween 20
F-PBS (Formalin PBS)	Paraformaldehyd 4% (w/v)
Heparin	50 mg/ml in EDTA, lösen bei 60°C
Hybridisierungslösung (HS) für <i>in situs</i> am Embryo	50% Formamid, 5x SSC, 100 µg/ml Lachssperma-DNA, 50 µg/ml Heparin, 0,1% Tween20
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in dH ₂ O
Lachssperma-DNA	10 mg/ml in 0,05 M Tris/HCl (pH 8,0), denaturiert bei 99°C, 10 min
Lithiumacetat	100 mM LiAc
NBT	100 mg/ml
NBT-Puffer (1x)	1 M Tris/HCl (pH 9,5), 5 M NaCl, 1 M MgCl ₂
PBS (10x)	1,3 M NaCl, 70 mM Na ₂ HPO ₄ , 30 mM NaH ₂ PO ₄
PBT (1x)	100 ml PBS (1x), 0,5 ml Tween 20
PEG	Polyethylenglucol, 50% (w/v)
Phalloidin-TRITC	1 mg/ml in 100% Methanol
Proteinase K	20 mg/ml
RF I	100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM KAc, 10 mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerin (auf pH 5,8 mit Essigsäure)

4. MATERIALIEN

RF II	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15% (v/v) Glycerin (auf pH 6,8 mit NaOH)
RNA-Hybridisierungslösung für <i>in situ</i> an adulten Testes	50% Formamid, 5x SSC, 100 µg/ml Heparin, 100 µg/ml Lachssperma- DNA, 0,1% Tween 20
S1	50 mM Tris/HCl (pH 8), 10 M EDTA, 100 g/ml RNase (1 mg/ml Stocklösung)
S2	200 mM NaOH, 1% (v/w) SDS
S3	2,6 M Kaliumacetat (pH 5,2 mit Essigsäure einstellen)
SSC (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Na ₃ Citrat (pH 7,0)
TBE (10x)	89 mM Tris/HCl (pH 8,2), 89 mM Borsäure, 2mM EDTA
TE (1x)	10 mM Tris (auf pH 8,0 mit HCl), 1 mM EDTA, auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen
X-Gal	80 mg/ml in 100% DMF
X-α-Gal	20 mg/ml in 100% DMF

4.5 Medien und Platten

4.5.1 Nähr- und Zuchtmedien für *Drosophila melanogaster*

Fruchtsaft-Agar	25% (w/v) Apfel- oder Traubensaft, 1,25% (w/v) Saccharose, 2,5% (w/v) Trockenhefe, 0,2% (w/v) Nipargin, 2,7% (w/v) Select Agar
Maismehl-agar	60% (w/v) Maismehl, 7,15% (w/v) Fructose, 1,2% (w/v) Trockenhefe, 60% (w/v) Malzextrakt, 0,14% (w/v) Nipargin, 0,7% (w/v) Select Agar, 0,6% (w/v) Propionsäure
Schneiderzellmedium	Gibco <i>Drosophila</i> Medium, 5 mg/ml Penicillin/Streptomycin, 10% fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert)

4.5.2 Nähr und Zuchtmedien für *E.coli*

LB-Medium (Luria-Bertani)	1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 0,5% (w/v) NaCl, (2% (w/v) Bacto-Agar für LB-Platten)
---------------------------	--

4.5.3 Nähr und Zuchtmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

4. MATERIALIEN

YPD-Platten	5% (w/v) YPD-Broth, 2% (w/v) Select Agar für YPDA außerdem 0,003% Adenin Hemisulfat zufügen
YPD-Medium	5% (w/v) YPD-Broth, für YPDA außerdem 0,003% Adenin Hemisulfat zufügen

4.5.4 MATCHMAKER Two-Hybrid-System 2

Selektionsplatten	6,7g/l Yeast nitrogen base w/o aa, 2% (w/v) Select Agar, 10% (v/v) 10x DO Solution, 10% (v/v) Leucin, 10% (v/v) BU- Salze, 2% (v/v) Glucose
Induktionsplatten	6,7g/l Yeast nitrogen base w/o aa, 2% (w/v) Select Agar, 10% (v/v) 10x DO Solution, 10% (v/v) BU- Salze, 2% (v/v) Galaktose, 1% Raffinose, 80 µg/ml X-Gal

4.5.5 MATCHMAKER Two-Hybrid-System 3

Selektionsplatten	6,7g/l Yeast nitrogen base w/o aa, 2% (w/v) Select Agar, 10% (v/v) 10x DO Solution, 10% (v/v) Adenin, 2% (v/v) Glucose
Induktionsplatten	6,7g/l Yeast nitrogen base w/o aa, 2% (w/v) Select Agar, 10% (v/v) 10x DO Solution, 2% (v/v) Glucose, 80 µg/ml X-α-Gal

4.6 Enzyme

AccuPrime Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Gateway LR [®] Clonase [™] II Enzym Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Axon-Taq-DNA-Polymerase	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Roche

4. MATERIALIEN

	Diagnostics, MBI Fermentas, Heidelberg, New England Biolabs, Frankfurt
RNase A	Boehringer, Mannheim
SP6-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T3-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, Heidelberg
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Peqlab, Erlangen
Vent DNA-Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt
<i>PfuUltra</i> HF DNA- Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt

4.7 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (chemischkompetent)
One Shot® TOP10	<i>hsdR</i> , <i>mrcA</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> (chemischkompetent) (Invitrogen, Karlsruhe)

4.8 Insekten Zellkulturlinie (*Drosophila melanogaster*)

Schneiderzellen (SL2 Zellen) aus OregonR *Drosophila melanogaster* Embryonen (Schneider, 1972)

4.9 Hefestämme (*Saccharomyces cerevisiae*)

MATCHMAKER Two-Hybrid 3, Clontech

AH109	<i>MAT1α</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2::GAL1UASGAL1TATA-HIS3</i> , <i>GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ</i> (James et al., 1996)
-------	--

4. MATERIALIEN

MATCHMAKER Two-Hybrid 2, Clontech

EGY48c *MAT α , his3, trp1, ura3, LexAop(6x)-LEU2* (Estojak *et al.*, 1995)

4.10 Antikörper

Tabelle 4.1: **Verwendete Antikörper.**

Primäre Antikörper	
anti- β 3-Tubulin (aus Meerschweinchen)	1:10000 (Buttgereit <i>et al.</i> , 1996)
anti- β -Galactosidase (aus Kaninchen)	1:5000 (Cappel, Hamburg)
anti-GFP (aus Kaninchen)	1:1000 (Abcam, Cambridge ab6556)
anti-HA (aus Maus)	1:500 (Convance, Münster)
anti-HA- Fluorescein (aus Ratte)	1:10 (Roche, Mannheim)
anti-Myc (aus Maus)	1:50 (Hybridoma Bank, Iowa 9E10)
anti-Mef2 (aus Kaninchen)	1:500
anti-Tnl J4 (aus Kaninchen)	1:100 und 1:50 (von Dr. Alberto Ferrus zur Verfügung gestellt, Sahota <i>et al.</i> , 2009)
Sekundäre Antikörper	
anti-Meerschweinchen-IgG, Cy2/ Cy3 gekoppelt (aus Ziege)	1:200 (Dianova, Hamburg)
anti-Kaninchen-IgG, Cy2/Cy3/Cy5 gekoppelt (aus Ziege)	1:200 (Dianova, Hamburg)
anti-Maus-IgG, Cy2/Cy3 gekoppelt (aus Ziege)	1:200 (Dianova, Hamburg)
anti-Digoxigenin-AP(Fab-Fragment)	1:5000 (Sonden-Test); 1:2000 (<i>in situ</i> -Hybridisierung) (Roche, Mannheim)
anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert und HRP gekoppelt (aus Ziege)	1:400
anti-Meerschweinchen-IgG, biotinyliert und HRP gekoppelt (aus Ziege)	1:400

4.11 Vektoren und Konstrukte

Tabelle 4.2: **Verwendete Vektoren und Konstrukte.**

Plasmid	Größe	Beschreibung	Referenz
Klonierungs- und Expressionsvektoren			
pCR®II-TOPO	3,9 kb	Direkte Klonierung von PCR Produkten mit 3'-überhängenden Desoxyadenosinenden, Amp Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pCR®-Blunt	II- 3,5 kb	Direkte Klonierung von PCR	Invitrogen, Karlsruhe

4. MATERIALIEN

TOPO		Produkten mit glatten Enden, Kan Resistenz	
pENTRTM/D-Topo®	2,58 kb	Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten mit CACC Überhang, Umklonierung in Vektoren des Gateway® -Systems, Kan Resistenz	Invitrogen, Karlsruhe
pBlueScriptII SK+/-	2,9 kb	Klonierungsvektor, Ampecillin Resistenz	Stratagene, Heidelberg
pFL-1	2,9 kb	cDNA-Klonierungsvektor, Derivat des pBlueScriptII-SK+ Vektors, Amp Resistenz	BDGP
pOT2	1,5 kb	cDNA-Klonierungsvektor, Chl Resistenz	BDGP
twipCaSpeR4	9,7 kb	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (Genen), die unter Kontrolle des twist-Promotors gebracht werden müssen um eine Mesoderm-spezifische Expression zu erzwingen	Arno Müller, Dundee, UK
pUAST eGFP/mcherry	9,7kb	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten, die mit einem eGFP- bzw. mcherry-Tag versehen werden sollen	Christina Rathke, Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl
pUAST-attB-rfa	11,2 kb	Gateway-Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten	S.Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
pUAST-attB-rfa-eGFP	11,9 kb	Gateway-Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten, die mit einem eGFP-Tag versehen werden sollen	S.Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
pUAST-attB-rfa-10xmyc	11,6 kb	Gateway-Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten, die mit einem myc-Tag versehen werden sollen	S.Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
pUAST-attB-rfa-mcherry	11,9 kb	Gateway-Vektor zur gerichteten Klonierung von PCR-Produkten mit CCAC-Überhang, die mit einem mcherry-Tag versehen werden sollen	S.Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Hefevektoren zum Hefe-Zwei-Hybrid-System			
pB42AD	6,45 kb	Vektor mit der B42-Aktivierungsdomäne, trägt zusätzlich Amp. Resistenz und <i>trp1</i> Auxotrophie Marker	MATCHMAKER 2-Hybrid System 2; Clontech
pGilda	6,6 kb	Vektor mit der LexA-DNA-Bindedomäne, Amp. Resistenz und <i>his3</i> Auxotrophie Marker	MATCHMAKER 2-Hybrid System 2; Clontech
pACT2	8,1 kb	Vektor für den Hefe-2-Hybrid Screen, enthält Gal4-Aktivierungsdomäne und eine <i>Drosophila</i> cDNA-Genbibliothek,	MATCHMAKER 2-Hybrid System 3; Clontech

4. MATERIALIEN

		Amp. Resistenz, <i>leu2</i> Auxotrophie Marker	
pGADT7	8,0 kb	Vektor mit der Gal4-Aktivierungsdomäne, Amp. Resistenz und <i>leu2</i> Auxotrophie Marker	MATCHMAKER 2-Hybrid System 3; Clontech
pGBKT7	7,3 kb	Vektor mit der Gal4-Bindedomäne, Kan. Resistenz und <i>trp1</i> Auxotrophie Marker	MATCHMAKER 2-Hybrid System 3; Clontech
pCL1	15,3 kb	Vektor zur Positivkontrolle; beinhaltet natives Gal4, Amp. Resistenz und <i>leu2</i> Auxotrophie Marker	MATCHMAKER 2-Hybrid System 3; Clontech
sonstige Vektoren			
pπ25.7wc		Helferplasmid zur Transformation des pUAS-Expressionsvektors ins Genom, kodiert für Transposase	Karess und Rubin, 1984

4.12 Verwendete cDNAs

Die cDNAs wurden von Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) bezogen und als Matrize für die Herstellung von RNA-Sonden und als Template für die PCR verwendet.

Tabelle 4.3: **Verwendete cDNAs.**

cDNA	Gen	Vektor
LD15851	<i>chickadee</i>	pBluescriptSK-
LD43495	<i>kette</i>	pOT2
IP12293	<i>twinstar</i>	pOT2
LD27045/RE63353	<i>flare</i>	pOT2/ pFLC-I
LD37470	<i>twinfilin</i>	pOT2
LD37992	<i>coronin</i>	pOT2
LD19991/LD47929	<i>sra1</i>	pBluescriptSK-/pOT2
LD20767	<i>pak</i>	pBluescriptSK-
LP09923	<i>csk</i>	pOT2
GM04081	<i>wupA</i>	pOT2
SD23839	<i>Roc1a</i>	pOT2
RE68367	<i>tweedleG</i>	pFLC-I
GH10931	<i>CG32082</i>	pOT2

4. MATERIALIEN

4.13 Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide sind kurzkettige, synthetische, einzelsträngige Nukleinsäuren, die in PCR- und Sequenzierungsreaktionen als Primer eingesetzt werden. Alle in der Tabelle aufgeführten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen und sind in 3'→ 5' Richtungen zu verstehen.

Tabelle 4.4: **Verwendete Oligonukleotide.**

Vektorspezifische Primer zur Durchführung von Sequenzierungsreaktionen.	
pUA3EC (pUAST)	CTGCAACTACTGAAATCTGCC
pUA5XB (pUAST)	TCTCTGTAGGTAGTTTGTCC
M13-for (Topo)	GTAAAACGACGGCCAG
M13-rev (Topo)	CAGGAAACAGCTATGAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG
3' DNA-BD (pGBKT7)	ATCATAAATCATAAGAAATTCGCC
3' DNA-AD (pGADT7)	AGATGGTGCCACGATGCACAG
pUAS-rfa-EGFP-rev	TGCAGATGAACTTCAGGGTC
pUASst-sv40-rev	TAGAGCTTTAAATCTCTGTAGG
pUASst-hsprom-for	AGTGCAAGTTAAAGTGAATCAAT
pUAS-rfa-mcherry-rev	ATCTCGAACTCGTGGCCGTT
Primer für <i>rac1</i> und <i>rac2</i> zur Durchführung einer zielgerichteten Mutagenese. Der eingefügte Austausch ist mit dem kleinen Buchstaben markiert. Für die aktivierte Form wurde die Aminosäure Glycin an der Position 12 gegen Valin ausgetauscht (G12V). Für die inaktive Form wurde an der Position 17 Threonin gegen Asparagin ausgetauscht (T17N).	
rac1ssmact-fw	GTCGTGGGCGACGtAGCCGTGGGAAAG
rac1ssmact-rev	CTTTCCCACGGCTaCGTCGCCCACGAC
rac1fw-inact	CCGTGGGAAAGAaCTGCCTGCTGATC
rac1rev-inact	GATCAGCAGGCAGtCTTTCCCACGG
rac2fw-ssmact	GTTGTGGGCGACGtAGCGGTGGGAAAG
rac2rv-ssmact	CTTTCCCACCGCTaCGTCGCCCACAAC

4. MATERIALIEN

rac2fw-inact	CGGTGGGAAAGAaCTGCCTGCTGATC
rac2rv-inact	GATCAGCAGGCAGtCTTTCCCACCG
Primer für <i>rac1</i> und <i>rac2</i> zur Klonierung in den pGBKT7-Vektor für den Hefe-Zwei- Hybrid Screen, sowie direkte Interaktionstests mittels Matchmaker 3- System.	
rac1pGBKfwEcoRI	GAATTCATGCAGGCGATCAAG
rac1pGBKrewBamHI	GGATCCTTAGAGCAGGGCG
rac2pGBKfwEcoRI	GAATTCATGCAGGCCATCAAG
rac2pGBKrewBamHI	GGATCCTTAGAGCAGGGCG
Primer für die konstitutiv aktive Form von <i>rac1</i> und <i>rac2</i> zur Klonierung in die Gateway-Vektoren für die Herstellung transgener Fliegen (Für die Klonierung der inaktiven Form wurden die gleichen Primer eingesetzt.)	
rac1act-fw-GW	caccATGCAGGCGATCAAGT
rac1act-rev-GW	TTAGAGCAGGGCGCACTTG
rac2act-fwGW	caccATGCAGGCCATCAAGT
rac2act-revGW	GAGCAGGGCGCACTTGTG
Primer zur Klonierung von <i>kette-fl</i> in pB42AD. Diese ungerichtete Klonierung wird über die XhoI Schnittstellen durchgeführt. Dieses Konstrukt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht hergestellt werden.	
kette-fw-pB42AD	CTCGAGATGGCACGCCCA
kette-rev-pB42AD	CTCGAGTTAGAGTGCCAGC
Primer für das 1-1041 bp -Fragment des <i>sra-1</i> -Gens zur Klonierung in pGADT7 (eingefügte Schnittstellen: EcoRI und XhoI).	
sra-fw-1-1041	GAATTCATGACGGAGAAGATTA
sra-rev-1-1041	CTCGAGATGCACCATTAGATC
Primer zur Klonierung von <i>sra1-fl</i> in pGADT7. Zur Generierung des Konstrukts wurden cDNAs verwendet, die Teilfragmente des <i>sra-1</i> Gens beinhalten (LD47929 und LD19991). Als Schnittstellen für das N-terminale Fragment wurden EcoRI und ClaI eingefügt, sowie ClaI und XhoI für den C-terminalen Teil.	
sra-fw-Eco ist komplementär zu sra-fw-1-1041(siehe oben)	
47929-rev-Cla1	ATCGATGCGATCCAGCCGTA
19991-fw-Cla1	ATCGATCGCATCTTTAAGAAC
19991-rev-Xho	CTCGAGTCAATTGTTTATGCTC
Primer zur Klonierung von <i>chic- fl</i> in pUAST-CYFP. Die <i>chic</i> cDNA (LD15851) wurde über	

4. MATERIALIEN

die eingefügten Schnittstellen EcoRI und NotI in den Zielvektor eingebracht.	
Eco-chic-CYFP-fw	GAATTCATGAGCTGGCAAGAT
Not-chic-CYFP-rw	GCGGCCGCACCCGCAAGT

4.14 Fliegenlinien (*Drosophila melanogaster*)

Die mit dem Präfix BL versehenen Linien wurden vom *Bloomington Drosophila Stock Center* (Indiana University, Bloomington, Indiana, USA) bezogen, Informationen über die einzelnen Linien sind auf der Homepage www.flystocks.bio.indiana.edu zu erfahren. Die anderen Fliegenlinien stammen aus Labor-internen Stammhaltungen.

Tabelle 4.5: **Verwendete Fliegenlinien.**

Linie	Beschreibung	Lokalisation	Referenz
<i>white</i>	<i>white</i> -Mutation der Augenfarbe (<i>w</i> -)	X Chr.	Laborzucht der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl
<i>M{3xP3-RFP.attP}</i>	zur ΦC31-vermittelten Integration von Gateway Konstrukten	3. Chr.	
Balancerlinien und Marker			
<i>lf/CyO hg lacZ</i>	<i>If (Inflated)</i> Marker für schmale Augen und verschmolzene Ommatidien; dominanter <i>CyO (Curly)</i> Marker für nach oben gebogene Flügel; <i>lacZ</i> -Expression im Hinterdarm	2. Chr.	M. Affolter
<i>Dr/TDIZ, Sb</i>	<i>Dr (Drop)</i> Marker für schmale tropfenförmige Augen; <i>lacZ</i> -Expression im Maxillarsegment, <i>Sb (Stubble)</i> verkürzte Thorakalborsten	3. Chr.	
<i>sp/CyO^{bb}; Dr/TDIZ, Sb</i>	<i>sp (sternopleura)</i> vermehrte Borsten auf der Sternopleuralplatte; <i>CyO P{wg-LacZ}</i> Expression in <i>wingless</i> -Muster; <i>Dr</i> Augenmarker, <i>lacZ</i> Expression, <i>Sb</i> verkürzte Borsten	2. + 3. Chr.	
<i>lf/CyO^{bb}; TM2, Ubx,e/TM6^{bb}, Hu, Tb</i>	<i>If</i> Augenmarker; <i>CyO P{wg-LacZ}</i> Expression in <i>wingless</i> -Muster; TM2 Balacer mit <i>Ubx (Ultrabithorax)</i> Marker, vergrößerte Haltere, zusätzliche Borste, <i>e (ebony)</i> dunkle Körperfärbung; TM6	2. + 3. Chr.	

4. MATERIALIEN

	Balancer mit <i>Hu</i> (<i>Humeral</i>) zusätzliche Humoralborste, TM6 <i>P{ftz-lacZ}</i> <i>LacZ</i> Expression in <i>ftz</i> Muster dicke Puppen		
sp/CyO; TM2,Ubx/MKRS,Sb (CSTM)	sp vermehrte Borsten, CyO Flügelmarker, MKRS Balancer mit Sb, Marker für verkürzte Thorakalborsten, TM2 Balancer mit Ubx	2. + 3. Chr.	
Gal4 - Treiberlinien			
<i>TGX-(twist-GAL4)</i>	Gal4 Expression im gesamten Mesoderm (Stadium 7-12)	X. Chr.	A. Michelson
<i>Mef2-Gal4</i>	Gal4 Expression im gesamten Mesoderm (Stadium 11-15)	3. Chr.	Ranganayakulu <i>et al.</i> , 1996
<i>P{UAS-Dcr}; Mef2-Gal4</i>	Gal4 und Dicer Expression im gesamten Mesoderm; Verwendung zur Überexpression von RNAi Linien	X.Chr+ 3. Chr	BL25756
<i>sg24-Gal4 (twist-Gal4)</i>	Gal4 Expression im gesamten Mesoderm (Stadium 7-12)	2. Chr.	A. Michelson
<i>rP298-Gal4 (duf-Gal4)</i>	Gal4 Expression in FCs, wachsenden Myotuben	X. Chr.	Menon und Chia, 2001
<i>sns pro3-Gal4</i>	Gal4 Expression in FCMs	2. Chr.	S. Abmayr
<i>P(GawB)NP3156/TM6</i>	Embryonale <i>flare</i> - Gal4 Expression in der Muskulatur	3. Chr.	104394 (Kyoto)
<i>P(GawB)NP3252/TM6</i>	Embryonale <i>sck</i> - Gal4 Expression in der Muskulatur	3. Chr.	104427 (Kyoto)
<i>c855a-Gal4</i>	Gal4 Expression in Testis- Muskeln	3. Chr.	BL6990
<i>1151-Gal4</i>	Gal4 Expression in der gesamten adulten Muskulatur	1. Chr.	zur Verfügung gestellt von L.A. Shashidara, IISER Pure
UAS- tragende Linien			
<i>P(UASp-GFP.Act5C) 2-1</i>	Expression der wildtypischen Form von Act5C. Protein mit einem N-terminalen GFP-Tag unter UAS-Kontrolle	2. Chr.	BL9258 (Roepert <i>et al.</i> , 2005)
<i>P(UASp-Act5C.mRFP)29</i>	Expression der wildtypischen Form von Act5C. Protein mit einem N-terminalen RFP-Tag unter UAS-Kontrolle	2. Chr.	BL24778
<i>P(UAS-tsr.S3E)3.3.1</i>	Expression der inaktiven Form des Twinstar Proteins unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	BL9239 (Ng und Luo, 2004)
<i>P(UAS-tsr.S3A)4.1</i>	Expression der konstitutiv- aktiven Form des Twinstar Proteins unter UAS-Kontrolle	1. Chr.	BL9236 (Ng und Luo, 2004)
<i>P(UAS-ssh.N)30</i>	Expression der wildtypischen Form von Slingshot mit einem	2. Chr.	BL9112

4. MATERIALIEN

	HA-Tag unter UAS-Kontrolle		
<i>P(UAS-ssh.CS)43</i>	Expression der kathalytisch inaktiven Form von <i>slingshot</i> unter UAS-Kontrolle, <i>basiert auf dem</i> Aminosäurenaustausch (Cys468Ser)	2. Chr.	BL9115
<i>P(UAS-capt.B)1</i>	Expression der wildtypischen Form des Capulet Proteins unter UAS-Kontrolle	2. Chr.	BL5943
<i>P(UAS-pod1.R)3/TM3</i>	Expression der wildtypischen Form des Pod1 Proteins unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	BL8801
<i>P(UAS-pod.GFPmyc)3/TM3</i>	Expression der wildtypischen Form des Pod1 Proteins unter UAS-Kontrolle, zusätzlich mit GFP und myc Tag versehen	3. Chr.	BL8800
<i>P(UAS-YFP.ltd)RhoGDI¹¹</i>	Expression der wildtypischen, YFP-getagten Form des Rab32 Proteins unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	BL9815
<i>P(UAS-Roc1a.D)8.1</i>	Expression der wildtypischen Form des Roc1a Proteins unter UAS-Kontrolle	2. Chr.	BL34047
<i>P(UAS-Hsc70-4.WT)B</i>	Expression der <i>Hsc70-4</i> kodierenden Genregion unter UAS-Kontrolle	2. Chr.	BL5846
<i>P(UAS-flare-GFP)</i>	Expression des <i>flare</i> Gens unter UAS- Kontrolle, mit eGFP-Tag versehen	1. und 3. Chr.	Ren <i>et al.</i> , 2007
<i>P(UAS-kette)</i>	Expression des <i>kette</i> Gens unter UAS- Kontrolle	3. Chr.	Transgene Linie der Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl
<i>P(UAS-sra-myr)/TDlacZ</i>	Expression des myristylierten <i>sra1</i> Gens unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	Schenk <i>et al.</i> , 2003
<i>P(UAS-sra-myrΔC)/TDlacZ</i>	Expression der myristylierten dominant negativen Form von <i>sra1</i> unter UAS- Kontrolle	3. Chr.	Schenk <i>et al.</i> , 2003
<i>P(UAS-rac2-eGFP)</i>	Expression des <i>rac2</i> Gens unter UAS- Kontrolle, mit eGFP-Tag versehen	3. Chr.	Doktorarbeit C. Dottermusch, 2009
<i>P(UAS-rac1^{N17})</i>	Expression der dominant negativen Form von <i>rac</i> unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	BL6292
<i>P(UAS-rac1^{V12})</i>	Expression der konstitutiv aktiven Form von <i>rac</i> unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	BL6291
<i>P(UAS-wupRA^{L9})</i>	Expression der <i>L9/wupRA</i> Isoform des <i>wupA</i> -Gens unter UAS-Kontrolle		zur Verfügung gestellt von A. Ferrus (Sahota <i>et al.</i> , 2009)
<i>P(UAS-Scar-fl-CYFP)</i>	Expression des <i>scar</i> Gens	2. Chr.	

4. MATERIALIEN

	unter UAS-Kontrolle		
Mutanten und Deletionslinien			
<i>tsr</i> ^{N121}	<i>twinstar</i> Nullmutation, P-Element-Ausschluss	2. Chr.	BL9109 (Chen et al., 2001)
<i>tsr</i> ^{N96A}	<i>twinstar</i> Nullmutation P-Element-Ausschluss	2. Chr.	BL9108 (Chen et al., 2001)
<i>dia</i> ⁵ P(neoFRT)	<i>diaphanous</i> hypomorph	2. Chr.	BL9138 (Grosshans et al., 2005)
<i>rac1</i> ^{J11} , <i>rac2</i> ^Δ /TM6 ^{bb}	Doppelmutante für <i>rac1</i> und <i>rac2</i>	3. Chr.	BL6677
<i>rac1</i> ^{J11} , <i>rac2</i> ^Δ Mtl ^Δ / TM6 ^{bb}	Trippelmutante für <i>rac1</i> und <i>rac2</i> und <i>mtl</i>	3. Chr.	BL6678
<i>chic</i> ²²¹	<i>chickadee</i> Nullmutation	2. Chr.	BL4892
<i>Arp3</i> ^{schwächling}	<i>Arp3</i> Nullmutation	3. Chr.	Berger et al., 2008
<i>wasp3</i>	<i>wasp</i> Nullmutation	3. Chr.	Ben-Yaacov et al., 2001
<i>Cortactin</i> ^{6A2} /TM6	<i>Cortactin</i> -Mutation, lebensfähig; P-Element „jump out“	3. Chr.	BL9367
<i>wip</i> ^{D30}	P-Element-Ausschluss	2. Chr.	Massarwa et al., 2007
<i>ena</i> ²¹⁰ /CyO	Nullmutante für <i>enabled</i> , durch ionisierte Strahlung eingefügte Mutation	2. Chr.	BL8569
<i>blow</i> ¹ /CyOhglacZ	EMS-Mutante, amorphes Allel	2. Chr.	Dobberstein et al., 1997
<i>capt</i> ^{E593} /CyO	neoFRT 40A	2. Chr.	BL5942
<i>capt</i> ^{E636} /CyO	neoFRT 40A	2. Chr.	BL5944
<i>flr</i> ¹ /TM2	EMS- Mutante für <i>flare</i>	3. Chr	BL1132
<i>flr</i> ³ /TM3	EMS- Mutante für <i>flare</i>	3. Chr	BL2371
<i>cpb</i> ^{F19} /CyO	EMS- Mutante für <i>caping protein beta</i>	2. Chr.	BL8808
<i>cpb</i> ^[M143] /CyO	EMS- Mutante für <i>caping protein beta</i>	2. Chr.	BL5586
<i>twf</i> ¹¹⁰ /TDlacZ	P-Element Insertionsmutante für <i>twinfilin</i> , Großteil der kodierenden Region ist zerstört	3. Chr.	BL34540 (Wang et al., 2010)
<i>twf</i> ¹⁰² /TDlacZ	P-Element Insertionsmutante für <i>twinfilin</i> , Großteil der kodierenden Region ist zerstört	3. Chr.	BL34542 (Wang et al., 2010)
<i>ssh</i> ¹⁻¹¹ /TM6	neoFRT, Funktionsverlustmutante	3. Chr.	BL9111
<i>P{EP}coro</i> ^{GE15547}	Insertion eines P-Elementes (42D6)	2. Chr.	BL26894
<i>Gap1</i> ^{B2} /TM3	EMS- Mutante für Gap1	3. Chr.	BL5781
<i>Gdi</i> ^{AF160} /CyO	EMS-Mutante mit Aminosäurenaustausch G147	2. Chr.	BL6473

4. MATERIALIEN

<i>fax</i> ^{M7}	EMS- Mutante für <i>fax</i> mit Aminosäurenaustausch L335	3. Chr.	BL8786
<i>P(3' LacW)Csk</i> ^{TD8} / <i>TM3</i>	Insertion von P(lacW) in <i>scK</i> zerstört das Gen, bewirkt aber die Expression von lacZ unter der Kontrolle von P-Element Transposase Promotor Genregion	3. Chr.	BL10244
<i>coro</i> ^{ex8} / <i>CyO</i>	kompletter Funktionsverlust des <i>coro</i> Gens, erzeugt durch die P-Element- Aktivität	2. Chr.	BL38104
<i>tum</i> ^{DH15} / <i>CyO</i>	EMS- Mutante für <i>tumbleweed/ RacGap50C</i> mit komplettem Funktionsverlust der Gens	2. Chr.	BL8687
<i>tum</i> ^{AR2} / <i>CyO</i>	EMS- Mutante für <i>tumbleweed/ RacGap50C</i> mit komplettem Funktionsverlust der Gens	2. Chr.	BL8686
<i>PBac(RB) CG16979</i> <i>e2981</i> / <i>TM6</i>	Insertion des P-Elements bedingt das Zerstören des <i>CG16979</i> Gens	3. Chr.	BL18103
<i>P(EPgy2)CdGAPr</i> ^{EY13451}	Insertion des P-Elements N-terminal in das <i>CdGAPr</i> -Gen, beinhaltet UAS als mobiles Aktivierungselement	2. Chr.	BL21418
<i>P(PZ)frc</i> ⁰⁰⁰⁷³ <i>CG32174</i> ⁰⁰⁰⁷³ <i>ry</i> ⁵⁰⁶ / <i>TM3</i>	Insertion des P-Elements zerstört die Funktionen der Gene <i>frc</i> , <i>CG32174</i> und <i>ry</i>	3. Chr.	BL11484
<i>mys</i> ¹ / <i>FM4</i>	kompletter Funktionsverlust des <i>myospheroid</i> Gens unter Einwirkung eines Mutagens	1. Chr.	BL59
<i>P(EPgy2)EF2b</i> ^{EY02807} / <i>CyO</i>	Insertion des P-Elements N-terminal in das <i>Ef2b</i> -Gen, beinhaltet UAS als mobiles Aktivierungselement	2. Chr.	BL21351
<i>P(XP)CG6567</i> ^{d09306}	P-Element Insertion in das <i>CG6567</i> Gen, beinhaltet UAS als mobiles Aktivierungselement	3. Chr.	BL19313
<i>P(lacW)OstStt3</i> ^{2D9} / <i>TM3</i>	P-Element Insertion in das <i>Oligosaccaryltransferase3</i> Gen, bedingt embryonale Letalität	3. Chr.	BL10340
<i>osa</i> ² / <i>TM6</i>	EMS-Mutante für <i>osa</i> mit partiellem Funktionsverlust des Gens (hypomorph)	3. Chr.	BL3616
<i>sas</i> ¹⁵ / <i>TM3</i>	EMS-Mutante für <i>sas</i> mit larvaler Letalität	3. Chr.	BL2098
<i>Df(1) pod1</i> ^{Δ17} / <i>FM7C</i>	Defizienzlinie für <i>pod1</i> ; chromosomal deletierter Bereich: 6D2-6D3	1. Chr.	BL8749
<i>Df(2L)DS6</i>	Defizienzlinie für <i>dia</i> ; chromosomal deletierter	2. Chr.	BL2386

4. MATERIALIEN

	Bereich: 38E2--39E7		
<i>Df(2L)E110</i>	Defizienzlinie für <i>chic</i> ; chromosomal deletierter Bereich: 25F3--26D11	2. Chr.	BL490
<i>Df(3R)Bsc318/TM6C</i>	Defizienzlinie für <i>ssh</i> ; chromosomal deletierter Bereich: 96B2-96B20	3. Chr.	BL 24344
<i>Df(2R) Bsc261/CyO</i>	Defizienzlinie für <i>coro</i> ; chromosomal deletierter Bereich: 42D1-42E5	2. Chr.	BL23161
<i>Df(3L)Bsc442/TM6</i>	Defizienzlinie für <i>CG16976</i> ; chromosomal deletierter Bereich: 71D2-71E3	3. Chr.	BL24946
<i>Df(1)G1/FM7C</i>	Defizienzlinie für <i>Roc1a</i> ; chromosomal deletierter Bereich: 1B13-1B13	1. Chr.	BL34050
Doppelmutanten (Generierung in den Arbeitsgruppen Önel und Renkawitz-Pohl)			
<i>scar^{Δ37}, wip^{67/15}/CyO</i>	Doppelmutante für <i>scar</i> und <i>wip</i>		Berger <i>et al.</i> , 2008
<i>dock⁰⁴⁷²³, wip^{67/15}/CyO</i>	Rekombinante für <i>dock</i> und <i>wip</i>		Prof. S. Önel, Kaipa <i>et al.</i> , 2013
RNAi- Linien			
<i>P(GD12603)v22850</i>	RNAi- Linie für <i>Aip1</i>	3. Chr.	v22850
<i>P(GD9586)v25344</i>	RNAi –Linie für <i>limk</i>	2. Chr.	v25344
<i>P(GD9586)v25343</i>	RNAi –Linie für <i>limk</i>	2. Chr.	v25343
<i>P(TRiP.GL00044)attP2</i>	RNAi- Linie für <i>csk</i>	3. Chr.	BL35174
<i>P(GD7990)v7145</i>	RNAi- Linie für <i>tum</i>	2. Chr.	v7145
<i>P(TRiP.JF02172)attP2</i>	RNAi-Linie für <i>wupA</i>	3. Chr.	BL31893
<i>P(TRiP.HMS00555)attP2</i>	RNAi-Linie für <i>fax</i>	3. Chr.	BL33687
<i>P(GD16917)v50019</i>	RNAi- Linie für <i>CG32082</i>	3. Chr.	v50019
<i>P(GD11477)v34907</i>	RNAi- Linie für <i>sra1</i>	2. Chr.	v34907
<i>P(GD4035)v12553</i>	RNAi- Linie für <i>pak</i>	1. Chr.	v12553
<i>P(TRiP. HMS00353) attP2</i>	RNAi- Linie für <i>Roc1a</i>	3. Chr.	BL32362
<i>P(TRiP.JF01660)attP2</i>	RNAi- Linie für <i>RhoGap93B</i>	3. Chr.	BL31167
<i>P(TRiP.JF01656)attP2</i>	RNAi- Linie für <i>RhoGap5A</i>	3. Chr.	BL31163
<i>P(TRiP.JF02500)attP2</i>	RNAi- Linie für <i>exd</i>	3. Chr.	BL29338
<i>P(TRiP.HM04015)attP2/ TM3</i>	RNAi- Linie für <i>Bap55</i>	3. Chr.	BL31708
<i>P(TRiP.HMS00463)attP2</i>	RNAi- Linie für <i>pGant6</i>	3. Chr.	BL32463
<i>P(TRiP.JF01764)attP2</i>	RNAi- Linie für <i>staußen</i>	3. Chr.	BL31247
Im Rahmen dieser Arbeit generierte Fliegenlinien			
Transgene Linien			
<i>tsr-pUAST-attB-rfa-eGFP</i> (C-terminaler Tag)	Expression der wildtypischen Form von <i>twinstar</i> unter UAS- Kontrolle	3. Chr.	
<i>RhoGap15B-pUAST-attB- eGFP-rfa</i> (N-terminaler Tag)	Expression der wildtypischen Form von <i>RhoGap15B</i> unter UAS-Kontrolle	3. Chr.	
<i>RhoGap15B-pUAST- CYFP-myc</i>	Expression der wildtypischen Form von <i>RhoGap15B</i> unter UAS-Kontrolle, mit 2xmyc-	3. Chr.	

4. MATERIALIEN

	Tag versehen		
<i>cortactin</i> ΔA1- pUAST	Expression eines Deletionskonstrukts von <i>cortactin</i> unter UAS-Kontrolle, putative A- Domäne ist deletiert	2. und 3. Chr.	
<i>capt-pUAST-attB-rfa-10xmyc</i> (N-terminaler Tag)	Expression der wildtypischen Form von <i>capulet</i> unter UAS-Kontrolle, mit 10xmyc-Tag versehen	3. Chr.	
<i>capt-pUAST-attB-rfa-eGFP</i> (N-terminaler Tag)	Expression der wildtypischen Form von <i>capulet</i> unter UAS-Kontrolle, mit eGFP-Tag versehen	3. Chr.	
<i>rac1</i> V12-pUAST-attB-rfa	Expression der konstitutiv aktiven Form von <i>rac1</i> unter UAS-Kontrolle, das Konstrukt trägt kein Tag	2. Chr.	
Doppelmutanten			
<i>P(UAS-sra-myr), rac1^{J11}, rac2^Δ/TDIZ</i>	Rekombinante für das dritte Chromosom, Verwendung für Rettung von <i>rac1^{J11}, rac2^Δ</i> Doppelmutante durch die ektopische Expression von <i>sra-myr</i> , Vorhandensein von UAS-Konstrukt mittels PCR überprüft	3. Chr.	
<i>P(UAS-Rac2-eGFP), rac1^{J11}, rac2^Δ/TDIZ</i>	Rekombinante für das dritte Chromosom, Verwendung für Rettung von <i>rac1^{J11}, rac2^Δ</i> Doppelmutante durch die ektopische Expression von <i>Rac2-eGFP</i> , Vorhandensein von UAS-Konstrukt mittels PCR überprüft	3. Chr.	
<i>P(UAS-tsr-eGFP), rac1^{J11}, rac2^Δ/TDIZ</i>	Rekombinante für das dritte Chromosom, Verwendung für Rettung von <i>rac1^{J11}, rac2^Δ</i> Doppelmutante durch die ektopische Expression von <i>tsr-eGFP</i> , Vorhandensein von UAS-Konstrukt mittels PCR überprüft	3. Chr.	
<i>P(UAS-kette), rac1^{J11}, rac2^Δ/TDIZ</i>	Rekombinante für das dritte Chromosom, Verwendung für Rettung von <i>rac1^{J11}, rac2^Δ</i> Doppelmutante durch die ektopische Expression von <i>kette</i> , Vorhandensein von UAS-Konstrukt mittels PCR überprüft	3. Chr.	
<i>P(UAS-racY40-myc); blow¹/CyO</i>	Doppelmutante für <i>UAS-rac</i> und <i>blow¹</i> , Verwendung zur Rettung von <i>blow¹</i> -	2. Chr.	

4. MATERIALIEN

	Muskelphänotyp durch <i>UAS-rac1</i>		
<i>P(UAS-rac^{N17}), P(UAS-tsrs3E)/TDIZ</i>	Rekombinante für <i>UAS-rac^{N17}</i> und <i>UAS-tsrs3E</i> zur ektopischen Expression einer inaktiven Form von <i>tsr</i> im <i>rac^{N17}</i> -Hintergrund	3. Chr.	
<i>blow¹, P(UAS-HA-Scar)/CyO</i>	Rekombinante für <i>blow¹</i> und <i>UAS-Scar</i> zur Rettung des <i>blow¹</i> -Phänotyps	2. Chr.	
<i>chic²²¹/CyOftzlacZ; Arp³/TM6,wglacZ</i>	Doppelmutante für <i>chicadee</i> und <i>Arp3</i>	2. und 3. Chr.	
<i>Sp/wip^{D30}, chic²²¹; Dr/TDIZ</i>	Doppelmutante für <i>chicadee</i> und <i>wip</i> , für das dritte Chromosom markiert	2. und 3. Chr.	Doktorarbeit Verena Groth, 2011
<i>chic²²¹/CyO^{bb}; wasp3/TM6^{bb}</i>	Doppelmutante für <i>chicadee</i> und <i>wasp³</i>	2. und 3. Chr.	
<i>tsr^{N96}/CyO^{bb}; twf¹⁰²/TM2^{bb}</i>	Doppelmutante für Aktin-Depolymerisierungsfaktoren <i>twinstar</i> und <i>twinfilin</i>	2. und 3. Chr.	
<i>tsr^{N96}/CyO^{bb}; flr³/TM2^{bb}</i>	Doppelmutante für Aktin-Depolymerisierungsfaktoren <i>twinstar</i> und <i>flare</i>	2. und 3. Chr.	
<i>tsr^{N96}/CyO^{bb}; flr¹/TM2^{bb}</i>	Doppelmutante für Aktin-Depolymerisierungsfaktoren <i>twinstar</i> und <i>flare</i>	2. und 3. Chr.	
<i>cap^{E593}/CyO^{bb}; twf¹¹⁰/TM2^{bb}</i>	Doppelmutante für Aktin-Depolymerisierungsfaktoren <i>capulet</i> und <i>twinfilin</i>	2. und 3. Chr.	
<i>chic²²¹, ena²¹⁰/CyO, hglacZ</i>	Rekombinante für <i>chicadee</i> und <i>enabled</i>	2. Chr.	
<i>cap^{E636}, tsr^{N121}/CyOhglacZ</i>	Rekombinante für <i>capulet</i> und <i>twinstar</i>	2. Chr.	
<i>chic²²¹, cap^{E636}/CyhglacZ</i>	Rekombinante für <i>capulet</i> und <i>chicadee</i>	2. Chr.	
<i>tsr^{N110}, ssh¹⁻¹¹/TDlacZ</i>	Rekombinante für <i>twinstar</i> und <i>slingshot</i>	3. Chr.	
<i>P(UAS Act5C-RFP/CyO; P(UAS-rac^{N17})/TDlacZ</i>	Doppelmutante aus der dominant negativen Form von <i>rac</i> und der wildtypischen Form von Act5C	2. und 3. Chr.	

5. Methoden

5. 1 Genetische Arbeiten mit dem Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

5.1.1 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

Die Fliegen werden in zylindrischen Zuchtröhrchen in der Klimakammer bei 18°C oder 25°C gehalten. Die Generationszeit der Fliegen beträgt bei 25°C etwa 10 Tage, bei 18°C ca. 3 Wochen. Zur Ernährung der Larven werden die Röhrchen mit etwa 2 cm Maismehlagar gefüllt. Zusätzlich wird für die adulten Tiere Trockenhefe eingestreut. Dabei ist wichtig, dass der Fliegenbrei immer feucht bleibt und die Elterntiere nicht zu lange auf den Zuchtflaschen gelassen werden, um Milbenbefall zu vermeiden.

5.1.2 *Drosophila* Kreuzungen

5.1.2.A Ansetzen einer Kreuzung

Für eine Kreuzung ist wichtig, dass jungfräuliche Weibchen eingesetzt werden. Diese sind an ihrer hellen Körperfärbung und dem durchscheinenden Darm zu erkennen. In der Regel werden 3 weibliche Jungfrauen mit 1-2 Männchen zusammengesetzt.

5.1.2.B Balancerlinien

(nach Lindsley und Zimm, 1992)

Die mutanten Fliegenlinien sind oft homozygot letal und werden daher heterozygot gehalten. Da die meisten Mutationen rezessiv sind, sind sie im heterozygoten Zustand nicht zu sehen. In diesem Fall behilft man sich der Balancerchromosomen. Diese haben einen dominanten Marker, welcher deren Verfolgung ermöglicht. Durch eine homozygot letale Mutation auf dem Balancerchromosom wird zudem sichergestellt, dass alle Nachkommen heterozygot für den Balancer und die gewünschte letale Mutation sind, was die Haltung stabiler Stämme ermöglicht. Zusätzlich tragen diese balancierten Chromosomen eine Inversion, wodurch die Rekombination mit den anderen Chromosomen verhindert wird.

5.1.2.C Die ektopische Expression von Genen mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems

(nach Brand und Perrimon, 1993)

Das UAS-GAL4-System ermöglicht eine gezielte Proteinexpression in Zellen, in welchen es im Normalfall nicht aktiv wäre (Brand und Perrimon, 1993). Das Gal4 ist ein 881

5. METHODEN

Aminosäuren großes Protein, welches in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) als Transkriptionsregulator fungiert. Dieses Protein ist in der Lage an die UAS-Stelle (Upstream Activating Sequence), die dem Enhancer-Element in multizellulären Eukaryoten analog ist, zu binden und die Transkription des dahinter liegenden Zielgens zu aktivieren. Die Voraussetzung dieser ektopischen Expression ist, dass das GAL4-Gen und das UAS-Zielgen sich in verschiedenen transgenen Linien befinden. In der GAL4-Linie ist das Aktivator-Protein vorhanden, aber nicht das zu aktivierende Zielgen. Dagegen bleibt das Zielgen in der UAS-Linie untranskribiert, da der Aktivator fehlt. Bringt man die Aktivator-Linie und die Effektor-Linie kreuzungsgenetisch in einen gemeinsamen genetischen Hintergrund, so kommt es zur ektopischen Expression des UAS-Zielgens in bestimmten Geweben (Abb. 5.1). Es ist sehr wichtig, dass der Aktivator keine endogenen Bindungsstellen hat, sodass nur das gewünschte Gen ektopisch exprimiert wird.

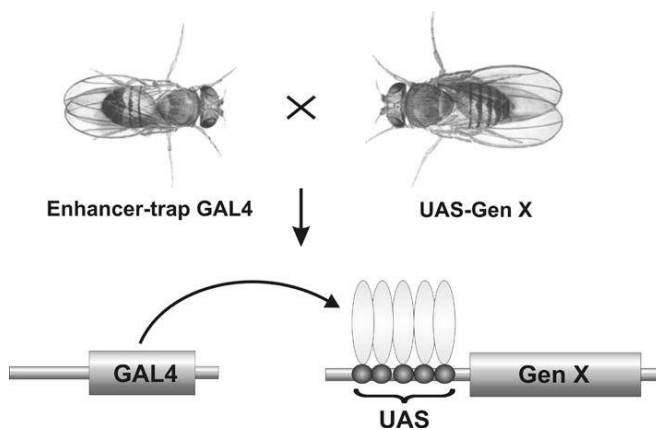


Abb. 5.1: ***Drosophila* UAS-GAL4-System.** In der Enhancer-trap-Fliege wird der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 gewebespezifisch exprimiert. Durch die genetische Kreuzung mit einer Fliege, die das zur Transkription vorgesehene Gen hinter der UAS- Bindesequenz trägt, wird dieses Gen durch eine gewebespezifische Expression des GAL4 angeschaltet (Botella und Schneuwly, 2004).

5.1.2.D Erzeugung einer Doppelmutante

Genetische Interaktionsstudien erlauben die Beziehung und die Reihenfolge von Genen in einem Signalweg zu untersuchen. Dabei betrachtet man den Phänotyp der Einzelmutanten und vergleicht diesen anschließend mit dem der Doppelmutanten, um möglicherweise Rückschlüsse auf die Beziehung betroffener Gene zu erhalten. Um den Phänotyp einer Einzelmutante mit dem der Doppelmutante vergleichen zu können, ist es wichtig zu wissen, auf welchen Chromosomen sich die jeweiligen Gene befinden. Liegt das eine Gen z. B. auf dem zweiten und das andere auf dem dritten Chromosom, so werden zunächst beide mutanten Stämme für das zweite beziehungsweise das dritte Chromosom mittels Doppelballancer-Linien markiert, um eine gerichtete Selektion zu ermöglichen. Im zweiten

5. METHODEN

Schritt werden die beiden mutanten Linien miteinander gekreuzt, sodass man bereits in der F1-Generation Doppelmutanten herstellen kann.

Liegen dagegen beide Mutationen auf dem gleichen Chromosom, kann eine Doppelmutante nur mit Hilfe der meiotischen Rekombination hergestellt werden. Dabei kommt es während der Meiose zur Neuverteilung der Gene auf dem Chromosom. Die zu rekombinierenden Fliegenlinien werden zunächst miteinander verkreuzt und somit in einen transheterozygoten Zustand gebracht. Im nächsten Schritt findet das eigentliche Rekombinationsereignis durch ein Bruchereignis und Fehlverhalten der Chromatiden, sogenanntes Crossover, in den Gameten der Weibchen statt. Dazu werden die transheterozygoten Tiere gegen einen Balancerstamm gekreuzt. Um eine stabile Linie zu etablieren, werden die Nachkommen erneut mit der Balancerlinie gekreuzt. Die hervorgehenden Fliegen sollen beide Mutationen auf einem Chromosom vereinen.

5.1.3 Mikroinjektion modifizierter P-Element Vektoren in *Drosophila* Embryonen

5.1.3.A Methode der Mikroinjektion

(nach Rubin und Spradling, 1982; Bischof *et al.*, 2007)

Bei der Mikroinjektion handelt es sich um die Generierung von transgenen Fliegenlinien durch die P-Element induzierte Keimbahntransformation. Hierfür wird die Plasmid-DNA in den posterioren Bereich der Embryonen, die den stündlichen Eiablagen entnommen wurden, injiziert. In dieser frühen Entwicklungsphase (Blastodermstadium) haben sich die Zellwände noch nicht gebildet und die Kerne liegen frei vor. Da das zu untersuchende DNA-Konstrukt in einen P-Element Expressionsvektor eingebracht ist, ist eine stabile Integration in das Genom von *Drosophila* möglich. Das P-Element ist ein doppelsträngiges DNA-Transposon, welches an beiden Enden gegenläufige Wiederholungssequenzen besitzt, sowie für das Gen Transposase kodiert. Dies ermöglicht eine keimbahnspezifische Transposition. Zusätzlich trägt das P-Element eine modifizierte Variante des Wildtyp-Allels des Gens *white*, welches als Augenmarker fungiert und die Gegenwart des P-Elements anhand der roten Augenfarbe in den adulten Fliegen kennzeichnet. Um transgene Organismen stabil zu etablieren, wird das Zielgen in den pUAST Expressionsvektor, welcher terminal gegenläufige Wiederholungssequenzen, sowie den *white*⁺ Augenmarker besitzt, kloniert. Die Transposase dagegen wird von dem zusätzlich injizierten p π 25.7wc- Helferplasmid zur Verfügung gestellt. Diese erkennt die terminalen Sequenzen des P-Elementes und katalysiert die willkürliche Integration ins Genom.

Eine präzise genomische Integration erlaubt das Φ C31-basierte Integrationssystem. Hierfür

5. METHODEN

werden bestimmte Fliegenstämme benutzt, die genau kartierte *attP*-Sequenzen besitzen. Dadurch wird ermöglicht die Ziel-Konstrukte an verschiedene vordeterminierte Orte im Fliegen-genom zu inserieren.

5.1.3.B Mikroinjektion in *Drosophila* Embryonen

Um die Mikroinjektion vorzubereiten werden 5 µg der aufgereinigten DNA mit 2,5 µl 10x-Injektionspuffer (1 mM NaHPO₄, 50 mM KCl) und (wenn benötigt) 2,5 µl Helferplasmid zusammengefügt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Der Ansatz wird für mind. 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, um das Verstopfen der Injektionsnadel zu vermeiden. In dieser Zeit werden die Embryonen von den stündlichen Eiablagen gesammelt und in einem 1:1 Gemisch aus Klorix und ddH₂O dechorionisiert. Die anschließend gewaschenen Embryonen werden auf einem mit Heptan-Kleber beschichteten Deckgläschen aufgereiht. Dabei sollte der posteriore Bereich zum Rand zeigen. Nach dem Trocknen und dem Übersichten mit dem Voltalef-Öl erfolgt die unverzügliche DNA-Injektion in den Bereich der sich bildenden Polzellen. Nach der Injektion werden die Embryonen erneut mit Öl überzogen und auf dem Deckgläschen in, mit Apfelsaftagar gefüllte, Petrischalen überführt. Die weitere Entwicklung bis zum Schlüpfen der Larven erfolgt bei 25°C.

5.1.3.C Etablierung transgener Fliegenstämme

Die nach ca. 24 Std frisch geschlüpften Larven werden in Maismehlagar-Röhrchen überführt und bis zum adulten Stadium hochgezogen. Diese Fliegen werden dann in Einzelpaarkreuzungen gegen den *w*-Stamm gekreuzt, da die Injektion in die Keimbahn erfolgt und der Erfolg des Transpositionereignisses erst in der nächsten Generation sichtbar wird. Die Expression des *white*⁺ Gens fungiert als Marker, so werden in der nächsten Generation die Nachkommen mit der gelben bis rötlichen Augenfarbe gesammelt. Um die Lokalisation des P-Elementes zu bestimmen werden diese mehrfach gegen einen Doppelbalancer-Stamm (CSTM) gekreuzt. Bei dem ΦC31-basierten Integrationssystem ist dieser Kreuzungsschritt nicht notwendig, da der Integrationsort festgelegt ist. Hier können die rotäugigen Nachkommen direkt miteinander gekreuzt und eine homozygote transgene Linie etabliert werden.

5.1.4 Sammeln von Embryonen

Die adulten Fliegen werden zur Eiablage auf Apfelsaft- oder Traubensaftflaschen gebracht und bei 25°C über Tag bzw. über Nacht gehalten. Danach werden die Tiere auf neue Flaschen umgesetzt und die alten Ablageflaschen bei 18°C bis zum benötigten Entwicklungsstadium nachgealtert. Anschließend werden diese bei 4°C gelagert, jedoch

maximal drei Tage.

5.1.5 Formaldehydfixierung von *Drosophila* Embryonen

Nachdem die adulten Fliegen auf Apfel- oder Traubensaftablagen gebracht wurden, werden die Embryonen über mehrere Tage gesammelt und bis zur Fixierung kühl gelagert. Anschließend werden diese in ein Siebchen überführt und in ein Lösungsgemisch aus Wasser und Klorix (1:1) gestellt. Durch diesen Vorgang löst sich die Schutzhülle des Eis, das Chorion. Nach 5-minütiger Inkubation werden die Embryonen 2-mal für 5 min mit Leitungswasser gewaschen, auf Papier trocken geblottet und in ein mit Heptan gefülltes Schälchen überführt. Die Embryonen werden mit einer Pipette in ein sauberes Falcon oder Eppendorfgefäß überführt, das Heptan durch 1 ml frisches ersetzt und zusätzlich 1 ml 4 %-tiges F-PBS zugefügt. Nach einer 20-minütigen Fixierung auf dem Schüttler wird die untere wässrige Phase abgezogen und 1 ml Methanol zugegeben. Um die Vitellinmembran abzulösen, werden die Embryonen kurzzeitig gevortext und anschließend 2-mal mit Methanol gewaschen. Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C. Bei einer Phalloidininfärbung, die das Aktin-Zytoskelett markiert, wird im letzten Schritt der Fixierung kein Methanol zugegeben. Die fixierten Embryonen bleiben für ca. 3 Std in Heptan bei Raumtemperatur stehen und werden anschließend einer Handdevitellinisierung unterzogen.

5.1.6 Hitzefixierung von *Drosophila* Embryonen

Das Sammeln und Dechorionisieren der Embryonen erfolgt wie in 5.1.4 und 5.1.5 beschrieben. Anschließend werden die Embryonen im Siebchen für 20-30 sec in auf 97°C erhitztes 1x PBS getaucht und sofort in eiskaltes 1x PBS überführt. Die somit hitzefixierten Embryonen werden in Heptan gesammelt und durch das Vortexen in einem 1:1 Heptan/Methanol Gemisch devitellinisiert.

5.2 Histologische Methoden

5.2.1 Immunhistologische Färbung an fixierten *Drosophila* Embryonen - Diaminobenzidin-Färbung

(nach Lawrence und Jonston, 1989)

Die Diaminobenzidin-Färbung (auch DAB-Färbung genannt) dient zum Nachweis von Proteinexpression in bestimmten Entwicklungsstadien oder auch in Geweben und Zellen. Ein primärer Antikörper bindet zunächst spezifisch an das Antigen. In einem zweiten Schritt bindet der biotinylierte Sekundärantikörper an den ersten Antikörper. Dieser kann mit Hilfe

5. METHODEN

des „Vectastain ABC Standard Kits“ nachgewiesen werden. Dabei bilden die an den Zweitantikörper gebundenen Biotin-Moleküle einen Komplex mit Avidin, das an eine Meerrettich - Peroxidase gekoppelt ist. Mit der DAB-Färbung kann die Peroxidase durch die Zugabe eines Katalysators (H_2O_2) die Oxidation von chromogenen Substanzen, wie Diaminobenzidin hervorrufen, was durch die Braunfärbung sichtbar wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine anti- β 3 Tubulin Färbung durchgeführt. Um die balancierten Embryonen von den nicht balancierten unterscheiden zu können, wird zusätzlich eine anti- β -Galaktosidase Färbung durchgeführt. Dafür werden die zuvor bereits fixierten Embryonen 3-mal für 10 min mit 1x PBT gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Dabei wird der anti- β 3 Tubulin Antikörper (aus Meerschweinchen) in einer Verdünnung von 1:10000, und der anti- β -Galaktosidase Antikörper (aus Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Am nächsten Tag wird der Überstand mit dem ersten Antikörper abgenommen und die Embryonen werden kurz in 1x PBT gewaschen, bevor diese 2-mal für 20 min schwenkend in 1x PBT gewaschen werden. Die Embryonen werden anschließend für 30 min in 2 % Ziegsenrum/PBT inkubiert, um die unspezifischen Bindestellen abzusättigen. Des Weiteren werden die Embryonen mit dem sekundären Antikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, inkubiert. Die Inkubation mit dem, auf wildtypischen Embryonen präabsorbierten, Zweitantikörper (anti-Kaninchen/ anti-Meerschweinchen) erfolgt in einer 1:400 Verdünnung über 1,5 Std. Nach Ablauf der Zeit wird der sekundäre Antikörper abgenommen und die Embryonen werden 3-mal für 10 min in 1x PBT gewaschen. Für die nachfolgend angewendete „Avidin- Biotinylated Emzyme Complex“- Methode wird parallel die Vectastain-ABC- Lösung angesetzt. Diese setzt sich aus 1 % der Lösung A, 1 % der Lösung B des „Elite Kits“ in 1x PBT der zusammen. Die Lösung wird auf die Embryonen gegeben und für 1 Std schwenkend inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen für 10 min in 1x PBT wird die DAB- Färbung in Blockschälchen durchgeführt. Es wird 1 ml der DAB-Fertiglösung auf die Embryonen gegeben und die Reaktion durch die Zugabe von 1 μl H_2O_2 gestartet. Die Färbung wird unter einem Binokular beobachtet und nach dem Auftreten einer ausreichend starken Färbung durch das mehrmalige Waschen mit 1x PBT gestoppt. Die gefärbten Embryonen werden in 70 % Glycerin auf einem Objektträger eingebettet.

5.2.2 Fluoreszenzfärbung an fixierten *Drosophila*- Embryonen

Bei der Fluoreszenzfärbung handelt es sich um eine immunhistologische Methode zum Nachweis von bestimmten Geweben, in diesem Fall der Muskulatur, durch einen fluoreszierenden Zweitantikörper. Dafür werden die zuvor fixierten Embryonen in Anlehnung

5. METHODEN

an die DAB-Färbung (siehe 5.2.1) in PBT gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag werden die Embryonen, nach mehreren Waschschritten in 1x PBT und dem Blocken im 2 %-tigen Ziegenserum, der Behandlung mit dem Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper unterzogen. Dieser Antikörper (gegen Meerschweinchen: Cy2 und gegen Kaninchen: Cy3) wird in einer Verdünnung von 1:400 auf die Embryonen gegeben und für 2 Std bei Raumtemperatur, im Dunkeln, unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach den drei 10-minütigen Waschschritten in 1x PBT können die Embryonen in Flouromount-GTM auf einem Objektträger eingebettet werden.

5.2.3 Immunologische Färbung an *Drosophila* Testes zum Sichtbarmachen der äußeren Muskelschicht

(nach Susic-Jung *et al.*, 2012)

Die Testes, wo die Spermiogenese stattfindet, sind von einer Basalmembran umgeben. Direkt darunter befindet sich eine Muskelschicht, die mit der hier beschriebenen Methode sichtbar gemacht werden kann. Die Testes werden in PBS präpariert und bis zur Vollendung der Präparation auf Eis gelagert. Die folgenden Schritte werden in Blockschälchen durchgeführt. Das frisch gewonnene Gewebe wird für 20 min in frisch angesetztem 4 %-tigen F-PBS fixiert. Nach dem 3-fachen Waschen in PBT für 20 min wird der erste Antikörper (anti-GFP 1:1000) auf die Testes gegeben und ü.N. bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wird 3-mal für 20 min in PBT gewaschen und der zweite Antikörper, zusammen mit Phalloidin-TRITC (1:500), zugefügt. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 1-1,5 Std. Die Testes werden 3-mal in PBT gewaschen und unter Verwendung von einem inversen Mikroskop direkt ausgewertet. Diese Methode ermöglicht zusätzlich das Untersuchen der äußeren Muskelschicht an den Geweben des gesamten männlichen Reproduktionsapparates (Paragonien, Ductus ejaculatorius und Spermienpumpe).

5.2.4 Immunologische Färbung an der indirekten Flugmuskulatur (IFM) von *Drosophila*

Um die indirekte Flugmuskulatur für den Antikörper zugänglich zu machen, erfolgt zuerst die Dissektion der Thoraxe in PBS. Diese werden zusätzlich dorsal aufgeschnitten und für 20 min in frisch angesetztem 4 %-tigen F-PBS fixiert. Nach der Fixierung wird die Kutikula entfernt und die IFM mit Phalloidin-TRITC (1:500) ü.N. gefärbt. Am nächsten Tag wird der Antikörper mit PBT abgewaschen und die auf dem Objektträger ausgebreitete IFM direkt mit Hilfe des konfokalen Laserscan-Mikroskops ausgewertet.

5. METHODEN

5.2.5 *In situ*-Hybridisierung an fixierten *Drosophila*-Embryonen

(nach Tautz und Pfeifle, 1989)

Die *in situ*-Hybridisierung beruht auf einer künstlich hergestellten RNA-Sonde, die in der Lage ist über Basenpaarungen spezifisch an die mRNA im Gewebe zu binden und die gewebespezifische Genexpression nachzuweisen.

5.2.5.A Herstellung einer DIG-markierten RNA-Sonde

Der erste Schritt ist die Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde mit definierter Länge, die an die komplementären Basen der mRNA bindet. Hierzu wird die Plasmid-DNA zunächst linearisiert. Dafür werden 3 µg plasmidärer DNA, 0,4 µl Enzym und 2 µl des 10x Puffers in einen Gesamtansatz von 20 µl gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch die anschließende Ethanol-Präzipitation wird die linearisierte DNA aufgereinigt und in 14 µl Wasser aufgenommen. Zur *in vitro* Transkription werden 2 µl 10x DIG-RNA-Labeling Mix, 2 µl 10x Transkriptionspuffer und 2 µl RNA-Polymerase (T7-, T3- oder Sp6-Polymerase) zugegeben und für 3 Std bei 37°C inkubiert. Die auf diese Weise synthetisierten *sense*- (5'→3') und *antisense*- (3'→5') Sonden werden mittels Ethanolpräzipitation gefällt (siehe 5.3.9) und in 20 µl eines 1:1 Gemischs aus dH₂O und Hybridisierungslösung aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgt bei -20°C.

5.2.5.B Qualitätstest für die DIG-markierte RNA-Sonde („Dot Blot“)

Um die Qualität und die für die *in situ*-Hybridisierung einzusetzende Verdünnung zu ermitteln, wird ein so genannter „Dot Blot“ durchgeführt. Dafür werden die Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 der hergestellten Sonde auf eine „Hybond-N“-Membran aufgetropft und diese in einem UV-Crosslinker fixiert. Anschließend wird die Membran für 10 min in 1x PBT gewaschen und in eine 1:5000 verdünnte Lösung aus α-DIG-AP-Antikörper gegeben. Die Inkubation erfolgt unter leichtem Schwenken für eine Stunde, bei Raumtemperatur. Die Membran wird erneut für 5 min in 1x PBT gewaschen und für 10 min in NBT-Puffer inkubiert. Nach dieser Umpufferung erfolgt die eigentliche Färbung. Dazu werden 2 ml NBT-Puffer, 4 µl NBT und 3,5 µl BCIP (X-Phosphat) auf die Membran gegeben und im Dunkeln unter leichtem Schwenken bis zur Farbreaktion inkubiert. Die Färbung wird durch das mehrmalige Waschen mit PBT gestoppt. Die Farbintensität der einzelnen Verdünnungen gibt an, welche Verdünnung für die *in situ*-Hybridisierung einzusetzen ist.

5. METHODEN

5.2.5.C In situ-Hybridisierung an *Drosophila*- Embryonen

Um die Expression von mRNA in embryonalen Geweben von *Drosophila melanogaster* nachzuweisen wird eine DIG-markierte RNA-Sonde verwendet. Das Digoxigenin wird dabei mit Hilfe eines Antikörpers, welcher an ein Enzym gekoppelt ist, sichtbar gemacht. Bei dem verwendeten Enzym handelt es sich um die Alkalische Phosphatase, die durch Zusatz von Reagenzien einen Farbstoff umsetzt.

Die Embryonen werden zuerst 3-mal für 5 min in 1 ml PBT rehydriert. Gleichzeitig wird das Wasserbad auf 97°C vorgeheizt und die Embryonen in das heiße, jedoch nicht mehr kochende Wasser getaucht. Nach einer 6-minütigen Inkubationszeit werden diese auf Eis überführt und anschließend 2-mal mit PBT gewaschen. Die Embryonen werden durch die 10 minütige Inkubation in 4 % F-PBS fixiert und 5-mal für 5 min. mit PBT gewaschen. Die Umpufferung erfolgt zuerst für 10 min in der Hybridisierungslösung/PBT (1:1), dann für 10 min. in der Hybridisierungslösung. Nach diesen Schritten werden die Embryonen im Heizblock für 1 Stunde bei 55°C prähybridisiert. Zur gleichen Zeit wird die Sonde dem „Dot Blot“ entsprechend in Hybridisierungslösung verdünnt und für 15 min bei 97°C denaturiert. 100 µl der Sonde werden auf die Embryonen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 55°C.

Am folgenden Tag wird die Sonde abgenommen und die Embryonen 3-mal für 20 min in der auf 55°C vorgewärmten Hybridisierungslösung/PBT (1:1) gewaschen, anschließend für 20 min in Hybridisierungslösung. Danach wird 5-mal 10 min in 1x PBT umgepuffert. Währenddessen wird der α -DIG-AP-Antikörper (1:2000) auf wildtypischen Embryonen präabsorbiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzudecken. Nach diesen Schritten werden jeweils 250 µl des vorbehandelten Antikörpers auf die Embryonen gegeben und 2 Std bei Raumtemperatur geschwenkt. Danach wird der Sekundärantikörper abgenommen und die Embryonen 3-mal mit 1x PBT gewaschen. Anschließend werden diese durch das 3-malige Waschen in NBT-Puffer (mit Zusatz von 0,1 % Tween) für jeweils 20 min umgepuffert. Für die Färbung werden die Embryonen in 1 ml NBT mit Tween in Blockschälchen überführt und 4 µl NBT und 3,5 µl BCIP zugegeben. Dabei dephosphoryliert die an den Zweitantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase das BCIP. Das entstehende Produkt reagiert in einer Redoxreaktion mit NBT zu zwei unlöslichen, blauen Farbstoffen. Diese sind mit bloßem Auge sichtbar und zeigen die Präsenz des zweiten Antikörpers an. Die Reaktion erfolgt im Dunkeln unter ständiger Beobachtung und wird, sobald eine Färbung aufgetreten ist, durch das mehrmalige Waschen mit PBT abgestoppt. Die Embryonen werden nun in Ethanol entwässert und in Epon-Harz eingebettet.

5. METHODEN

5.2.6 In situ-Hybridisierung an *Drosophila* Testis, Ovarien und Imaginalscheiben

(modifiziert nach White-Cooper *et al.*, 1998)

Zur Präparation der Testes werden jung geschlüpfte Männchen verwendet. Die Ovarien werden aus 1-2 Tage alten Weibchen präpariert. Die Imaginalscheiben werden aus den sich im dritten Entwicklungsstadium befindenden Larven entnommen. Die beschriebenen Gewebe werden in PBS präpariert und bis zur Vollendung der Präparation auf Eis gelagert. Anschließend werden diese für 20 min in frisch angesetztem 4 %- tigen F-PBS fixiert. Nach den drei 5-minütigen Waschschritten in 1x PBT erfolgt der Proteinase K-Verdau mit 2,5 µl (20 mg/ml) und 990 µl PBT für 90 sec. Diese Proteinase baut die fixierten Gewebe an und erlaubt ein erleichtertes Eindringen des Antikörpers. Der Dau wird durch die Inkubation mit Glycin (100µl Glycin (20 mg/ml) und 900 µl PBT) abgestoppt. Die Gewebe werden 2-mal für jeweils 5 min gewaschen und 20 min in 4 %-tigem F-PBS refixiert. Danach wird erneut 2-mal mit 1x PBT gewaschen. Die Umpufferung von PBT in Hybridisierungslösung wird durch drei Waschschrritte im Verhältnis 3:1, 1:1 und 1:3 für jeweils 10 min vollzogen. Gleichzeitig werden das Wasserbad auf 100°C und der Heizblock auf 55°C vorgeheizt. Nach dem dreifachen 5-minütigen Waschen in Hybridisierungslösung werden 100 µl vorgekochter (5 min bei 100°C) Hybridisierungslösung auf die Gewebe gegeben und 1 Std bei 55°C prähybridisiert. Während dieser Zeit wird die Sonde vorbereitet, indem diese zunächst 1:100 verdünnt und für 3 min bei 80°C erhitzt wird. Die Sonde wird bis zur Hybridisierung auf Eis gelagert. Die Hybridisierung erfolgt bei 55°C für 12-16 Std.

Am folgenden Tag werden die Proben mit vorgewärmter Hybridisierungslösung zunächst kurz gespült, dann für 15 min gewaschen. Nach der Umpufferung in PBT (1:3, 1:1, 3:1, für jeweils 15 min) wird erneut 4-mal in warmem PBT gewaschen und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Inkubation mit dem anti-*DIG-AP*- Antikörper (1:2000) erfolgt nichtschüttelnd ü.N. bei 4°C. Am nächsten Tag wird der Antikörper durch das 4-fache Waschen in PBT abgespült und anschließend dreimal in der frisch angesetzten Färbelösung gewaschen. Danach werden die Gewebe mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in Blockschälchen überführt und die Färbereaktion durch die Zugabe von 3,5 µl NBT sowie 3,5 µl X-Phosphat in 1 ml Färbelösung unter Lichtausschluss durchgeführt. Nachdem die gewünschte Signalintensität erreicht ist, wird die Färbung durch das mehrmalige Waschen mit PBT abgestoppt. Das gefärbte Gewebe wird durch eine Ethanol-Reihe entwässert (25 %, 50 %, 75 %, 100 %, für jeweils 5 min) und in Epoxidharz eingebettet.

5. METHODEN

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*- Zellen

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die kompetenten Zellen sind in der Lage, die im Medium vorhandene DNA aufzunehmen. Dies wird dadurch ermöglicht, dass die Bakterienzellen chemische oder elektrische Kompetenz erlangen. Dazu werden für den Ansatz 50 ml LB-Medium mit einer *E.coli*- Kultur inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsene Kultur wird 1:100 in frischem LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 hochgezogen. Anschließend werden die Zellen 10-60 min auf Eis inkubiert und bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird nun in 16 ml eiskaltem RFI-Puffer aufgenommen und erneut 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach der folgenden Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4°C) werden die Zellen in 4 ml RFI aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Danach sollen die Zellen möglichst schnell in 80-100 µl Aliquots aufgeteilt werden und im flüssigen Stickstoff eingefroren werden. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

5.3.2 Transformation von DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen

Die Transformation dient der direkten Aufnahme von freien DNA-Molekülen durch eine kompetente Bakterienkultur. In diesem Fall handelt es sich, um den chemisch kompetenten *E. coli* Stamm DH5α. Nach dem Auftauen der Zellen auf Eis werden 3 µg des DNA-Konstrukts auf die Zellen gegeben und 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock im Wasserbad bei 37°C für 2 min, der die Aufnahme der DNA möglich macht. Nach der Zugabe von 300 µl des vorgewärmten LB-Mediums wird der Ansatz für ca. 45 min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Folgenden werden die Bakterien auf die geeigneten Platten ausplattiert. Die Platten enthalten neben dem LB- Medium zusätzlich ein Antibiotikum, sodass nur die transformierten Bakterien darauf wachsen können.

5.3.3 Plasmidpräparation aus einer 4 ml Über-Nacht-Kultur (*Mini-Präp*)

(nach Birnboim und Doly, 1979)

Der Mini-Präp ist eine alkalische Lyse, die zur Isolation von geringen Plasmidmengen verwendet wird. Dies ist der erste Schritt, um die Aufnahme des richtigen Vektors durch die *E. coli* Zellen zu überprüfen. Dazu werden zunächst 1,5 ml der Über-Nacht -*E. coli*-Kultur bei 4.000 rpm für 5 min pelletiert. Nach dem Resuspendieren der Zellen in 250 µl der S1 Lösung, werden 250 µl der S2 Lösung zugegeben, wodurch die Zellen lysieren. Die Zeit zum

5. METHODEN

Lysieren beträgt 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgt die Neutralisierung mit der S3 Lösung. Nach mehrmaligem Invertieren wird bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert und der Überstand zu 600 µl (0,8 Volumen) vorgelegtem Isopropanol gegeben. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wird das Pellet mit 500 µl 70 % -tigem Ethanol bei 13.000 rpm für 10 min gewaschen. Im Weiteren wird das Pellet getrocknet und in 50 µl Wasser oder Puffer aufgenommen und zum Lösen bei 50°C inkubiert.

5.3.4 Plasmidpräparation aus einer 50 ml Über-Nacht-Kultur (Midi-Präp)

Mit dem *Midi-Prep Plasmid-DNA Kit* (Firma Genomed Jetstar) lässt sich die Plasmid-DNA einer Über-Nacht -*E. coli*-Kultur aufreinigen. Dazu werden die JETSTAR Säulen zunächst mittels 10 ml Lösung E4 equilibriert. Gleichzeitig werden die Zellen durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4°C pelletiert und anschließend in 4 ml Lösung E1 resuspendiert. Die Zellyse erfolgt durch die Zugabe von 10 ml des E2 Puffers. Nach vorsichtigem mehrfachen Invertieren wird das Lysat 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden zur Neutralisation 4 ml der E3 -Lösung zugegeben und nach mehrmaligem Invertieren erneut bei 4.000 rpm und Raumtemperatur für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird nun auf die bereits equilibrierte Säule geladen. Nachdem das Lysat durchgelaufen ist, wird die Säule mittels 10 ml E5-Lösung zweimal gewaschen. Die folgende Plasmid-Elution erfolgt unter Zugabe von 5 ml der Lösung E6. Anschließend wird die DNA in 0,7 Vol. Isopropanol durch das 45- minütige Zentrifugieren bei 4°C und 4.500 rpm präzipitiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die DNA wird in Wasser oder Puffer aufgenommen und bei 50°C gelöst.

5.3.5 Test-Verdau zum Mini- bzw. Midi-Präp

Um die Richtigkeit der isolierten DNA zu Überprüfen wird ein Test-Verdau durchgeführt. Dabei wird das Vektorprodukt mittels geeigneter Restriktionsenzyme verdaut. Von der in Wasser gelösten DNA werden 0,5 µg eingesetzt. Anschließend werden 2 µl des 10-fach konzentrierten Fast-Digest-Puffers und 0,4 µl Enzym zugegeben. Der Ansatz wird auf 20 µl Wasser aufgefüllt. Nach der 1- bis 2-stündigen Inkubation wird der Verdau unter Zugabe von Ladepuffer auf ein 1 %- Agarosegel aufgetragen (siehe 5.3.7).

5.3.6 Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila melanogaster* für PCR-Reaktionen (single fly Methode)

Bei einer genomischen DNA handelt es sich um die Gesamtheit der DNA, die die vollständigen genetischen Daten eines Organismus beherbergt. Zur Präparation von

5. METHODEN

genomischer DNA aus der adulten Fliege, wird diese in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und auf Eis betäubt. Anschließend wird diese in 10 µl SquiB- Puffer mit der Pipettenspitze zermahlen. Dem Ansatz werden zusätzlich 40 µl SquiB, sowie 1µl Proteinase K (20 mg/ml) zugefügt, die den Proteinabbau steuert. Die folgenden Temperaturschritte werden in einem PCR-Thermocycler durchgeführt. Durch die 30-minütige Inkubation bei 37°C werden die Proteine abgebaut. Danach wird die Proteinase K für 2 min bei 85°C inaktiviert. Für einen PCR-Reaktionsansatz werden 10 µl der gewonnenen DNA eingesetzt. Mittels dieser Methode ist es möglich bestimmte Gene oder DNA-Konstrukte in einer Fliegenlinie nachzuweisen (z.B. bei Herstellung einer Rekombinanten).

5.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

(nach Sambrock *et al.*, 1989)

Um die DNA der Größe und Struktur nach aufzutrennen wird ein Agarosegel verwendet. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäure-Stränge im elektrischen Feld durch die Gelmatrix zum Pluspol. Zusätzlich wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt, welches in die Nukleinsäuren interkaliert und dabei sein Absorptionsspektrum verändert. Diese Eigenschaft wird genutzt um die aufgetrennte DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen. Für die Herstellung eines 1 % -Agarosegels werden 4 g Agarose mit 400 ml 1x TBE-Puffer vermischt und aufgekocht. Nach kurzzeitigem Abkühlen werden ca. 8 µl Ethidiumbromid zugefügt. Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet. Den Proben wird vor dem Beladen des Gels Ladebuffer zugesetzt. Zusätzlich wird ein Marker aufgetragen, um die Fragmentgrößen abschätzen zu können. Die angelegte Spannung beträgt 60-80 V.

5.3.8 Die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

(nach Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988)

Die Polymerase Kettenreaktion dient der selektiven Vervielfachung bestimmter DNA-Fragmente. Das dafür verwendete Enzym, die DNA-Polymerase, bindet an einen einzelnen DNA-Strang und synthetisiert mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide (Primer) einen dazu komplementären Strang. Der PCR-Prozess besteht aus einer repetitiven Abfolge von mehreren Zyklen. Ein Zyklus setzt sich aus Denaturierung, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Elongation zusammen. In den folgenden Zyklen vermehren sich die gewünschten kurze DNA-Fragmente exponentiell.

5.3.8.A Primer-Design für PCR

Für die PCR oder auch DNA-Sequenzierung werden Primer benötigt. Diese Oligonukleotide dienen als Startpunkte für die DNA-Polymerase. Für das Design der Primer müssen zahlreiche Voraussetzungen erfüllt werden, damit die Bindung an das DNA-Template möglichst präzise ist. Die Primer für die PCR-Ansätze sind in der Regel 17-28 Nukleotide lang und enden im Idealfall mit der Base G oder C. Weiterhin sollte der GC-Anteil ca. 50-60 % betragen und die Schmelztemperatur (T_M) bei etwa 60°C liegen. Um diese zu berechnen, bedient man sich folgender Formel: $\text{Anzahl CG} \cdot 4 + \text{Anzahl AT} \cdot 2 = T_M$. Zusätzlich sollte die Bildung von „self-dimer“ vermieden werden und das Leseraster des Gens nicht zerstört werden. Dabei ist auf den Triplettcode zu achten. Sind Enzymschnittstellen notwendig, so werden diese am Anfang des „forward“-Primers bzw. am Ende des „reverse“- Primers eingebaut.

Bei der Klonierung mittels Gateway System der Firma Invitrogen muss an das 5' Ende des „forward“-Primers die CACC-Basenabfolge angehängt werden, um eine erfolgreiche Integration des Gens in den pEntr/D-Topo- Vektor zu gewährleisten.

5.3.9 Aufreinigung von DNA mittels Ethanol-Präzipitation

Die Methode der Ethanol-Präzipitation wird zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA verwendet. Dazu werden der DNA-haltigen Lösung 0,1 Volumenanteile 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumenanteile 95 % Ethanol zugegeben. Nach der 20-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm wird das Pellet in 70 %-tigem Ethanol durch einen erneuten Zentrifugationsschritt für 5 min gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wird in 20 µl Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

5.3.10 Klonierung eines PCR-Produkts in einen TopoTA-Vektor, TopoZeroBlunt-Vektor oder pEntr-Vektor

Bei der Klonierung wird ein zuvor mittels PCR amplifiziertes DNA-Produkt als Insert in einen Vektor integriert. Die Taq-Polymerase generiert während der PCR durch ihre Transposaseaktivität an 3'Enden einen A-Überhang. Der linearisierte TopoTA-Vektor besitzt seinerseits den dazu komplementären T-Überhang und zusätzlich das Enzym Topoisomerasel an den Enden des Vektors. Diese Eigenschaften werden genutzt, um das PCR-Produkt mit dem Vektor zu ligieren. PCR-Produkte, die keinen Nukleotidüberhang aufweisen, haben so genannte glatte Enden. Diese werden in den TopoBlunt-Vektor kloniert. Bei der Gateway-Klonierung wird der pEntr-Vektor als sog. Donor-Vektor verwendet. Dabei wird das in dem Vektor enthaltene *ccdB* Gen, welches an beiden Enden *attP*-

5. METHODEN

Verbindungsstellen trägt, gegen das PCR-Produkt ausgetauscht.

Für die Klonierung in die TopoTA bzw. TopoBlunt Vektoren wird ein Ansatz aus 1-5 µg PCR-Produkt, 0,5 µl Topo -Vektor in einem Gesamtvolumen von 6 µl angesetzt. Nach der 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird der Ansatz auf Eis gestellt. Die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen erfolgt direkt im Anschluss mit 3 µl des Reaktionsansatzes (siehe 5.3.2). Die Klonierung in den pEntr-Vektor erfolgt auf die gleiche Weise, ermöglicht aber eine zusätzliche Selektion der positiven Klone, da das *ccdB*-Gen toxisch auf den verwendeten Bakterienstamm wirkt. In diesem Fall sollten nach der Transformation nur diejenigen Zellen auf den Platten wachsen, die das Plasmid aufgenommen haben.

5.3.11 Präparativer Restriktionsverdau eines Vektors für Klonierungen

Um die Ligation einer Fremd-DNA mit einem Plasmid zu ermöglichen, wird dieses zunächst mit den geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert. Für den Ansatz werden 3 µg Vektor, 3 µl 10x Puffer und 1 µl Enzym in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C im Wasserbad für 2 Stunden. Wird der Vektor nur mit einem Enzym gedaut, muss dieser „gezippt“ werden. Bei diesem Vorgang werden die endständigen Phosphatreste abgespalten um Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden. Dazu wird dem Ansatz im Anschluss an die Inkubation 5 µl alkalische Phosphatase-Puffer (0,1 Volumen), 2,5 µl alkalische Phosphatase-Enzym (1U) in einem Gesamtvolumen von 50 µl zugegeben und erneut für 40 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgt danach für 20 min bei 65°C. Anschließend wird die DNA mittels Ethanol-Fällung gereinigt und aufkonzentriert (siehe 5.3.9).

5.3.12 Präparativer Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten für Klonierungen

Die Ligation eines bestimmten DNA-Fragments mit einem Vektor erfordert einen Restriktionsverdau mit den geeigneten Enzymen. Der Ansatz wird analog dem aus 5.4.11 angesetzt und für 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt jedoch eine Gelelektion.

Bei einer Gelelektion wird der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und bei einer Spannung von 45 bis 50 Volt aufgetrennt. Dieser Vorgang ermöglicht die Trennung des gewünschten DNA-Fragments von der Vektorbande. Läuft die DNA-Fragment-Bande auch in der richtigen Höhe, so wird diese mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mittels JETsorb-Kit eluiert. Um die Agarose aufzulösen, werden pro 100

5. METHODEN

mg Gel 500 µl des A1 Puffers und 12 µl JETsorb Suspension zugegeben und gevortext. Bei der im Anschluss folgenden 15-minütigen Inkubation bei 50°C wird die DNA gebunden. Dabei sollte jede 3 min kräftig geschüttelt werden. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl A1-Puffer gewaschen. Es wird erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min), der Überstand verworfen und geschüttelt. Anschließend wird 2-mal mit A2-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und der Überstand abgezogen. Das Pellet wird unter der Vakuumpumpe getrocknet. Die Elution der DNA wird durch die Zugabe von 20 µl Wasser auf das getrocknete Pellet und 5-minütige Inkubation bei 50°C ermöglicht. Danach wird 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt.

5.3.13 Präparativer Restriktionsverdau eines mittels PCR amplifizierten DNA-Fragments

Um ein bestimmtes DNA-Fragment direkt in den Zielvektor zu bringen, wird dieses zunächst mittels PCR amplifiziert. Dabei werden die Primer so „designed“, dass jeweils an den Enden geeignete Enzymschnittstellen eingebaut werden, die ebenfalls vervielfältigt werden. Nach Ablauf des PCR-Programms wird das gesamte Produkt gefällt und anschließend, mit zu den eingebauten Schnittstellen passenden Enzymen, verdaut. Dazu werden 3 µg des PCR-Produkts, 1 µl Enzym und 3 µl des 10x Puffers in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über 2 Stunden. Nach einer Ethanol-Fällung des entstandenen Produkts kann eine Ligation mit dem gewünschten Vektor angesetzt werden (siehe 5.3.9 und 5.3.14).

5.3.14 Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor

Bei einer Ligation wird ein bestimmtes DNA-Fragment in einen gewünschten Vektor eingefügt. Dafür ist zunächst ein Restriktionsverdau mit gleichem Restriktionsenzym notwendig, um kompatible Enden zu erzeugen (siehe 5.3.11 und 5.3.12). Für das einzusetzende Volumen bedient man sich der folgenden Formel: $[\text{Insertgröße (kb)} \times 50\text{-}100 \text{ ng}] : \text{Vektorgröße (kb)} = \text{einzusetzende Menge Insert (ng)}$. Im Normalfall wird das Insert in einem dreifachen molaren Überschuss in Relation zum Vektor eingesetzt. Zu den errechneten Vektor- und Insertmengen wird 1 µl T4-Ligase (1U) und 1/10 Vol. Puffer in einem 10 µl Gesamtvolumen zugegeben und bei 16°C über Nacht inkubiert. Alternativ kann die Probe für 2,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend kann eine Transformation mit dem gesamten Ansatz durchgeführt werden (siehe 5.3.2).

Bei einer Gateway-Klonierung ist ein enzymatischer Restriktionsverdau des Vektors und des Inserts nicht notwendig. Das zu klonierende Gen kann entweder 5´oder 3´ der *attR*-Seiten

5. METHODEN

eingbracht werden, je nachdem, ob es N- oder C-terminal fusioniert werden soll. Dazu werden 100 ng des Ziel-Vektors, sowie 100 ng des pEntr-Klons in einem Gesamtvolumen von 4 µl eingesetzt. Als Puffer wird 1x TE verwendet. Zusätzlich wird 1 µl des Clonase II Enzym-Mix der Firma Invitrogen zugefügt und für 1 Std bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 0,5 µl Proteinase K zugegeben, kurz gevortext und bei 37°C für 10 min inkubiert. Anschließend kann eine Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Zellen mit 1 µl des Ansatzes durchgeführt werden (siehe 5.3.2). Durch die unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen des pEntr (Kan) und des Zielvektors (Amp), sowie durch die Toxizität des ccdB-Genprodukts kann gezielt auf die Klone mit dem richtigen Konstrukt selektioniert werden. Ein weiterer Vorteil des Gateway-Systems ist die ΦC31-vermittelte Integration des generierten DNA-Konstrukts in das *Drosophila* Genom.

5.3.15 Die Durchführung einer *in vitro* zielgerichteten Mutagenese

(nach Papworth *et al.*, 1996)

Durch einen spezifischen Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren ist es möglich die Funktion eines Gens zu verändern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch einen Aminosäure-Austausch eine konstitutiv aktive bzw. dominant negative Form des daraus entstehenden Proteins (Rac1 und Rac2) erzeugt. Dazu werden zunächst die Primer so gewählt, dass diese zueinander komplementär sind, sowie eine Länge zwischen 25 und 45 Nukleotiden aufweisen. Die gewünschte Mutation wird in die Mitte der beiden Primersequenzen, die einen GC-Gehalt von mindestens 40 % haben sollen, eingebracht. Im weiteren Verlauf wird das „QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit“ verwendet. Die Amplifikation des mutierten Vektors erfolgt mittels PCR. Dazu werden in einem Ansatz 5 µl des 10-fachen Reaktionspuffers, 10 ng der dsDNA-Matrize, jeweils 125 ng der beiden Primer, 1 µl dNTP's (10 mM), sowie 1 µl der *PfuUltra* HF DNA- Polymerase zusammen pipetiert. Das folgende PCR-Programm soll auf 18 Zyklen beschränkt werden, um die maximale Reaktionseffizienz zu gewährleisten. Nach dem PCR-Programm wird 1 µl des DpnI Enzyms, welches das methylierte unmutierte Ausgangsplasmid verdaut, zu dem gesamten Reaktionsansatz gegeben und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Nach der Inkubation folgt die Transformation von 2-3 µl der DpnI-behandelten DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen (siehe 5.3.2). Die auf der LB-Platte am nächsten Tag zu findenden Klone sollten das mutierte Plasmid tragen. Zur Sicherheit sollte der präparierte Klon sequenziert und auf das Vorhandensein des gewünschten Aminosäureaustauschs überprüft werden.

5.3.16 Das Hefe-Zwei-Hybrid System

5.3.16.A Das Modell des Hefe-Zwei-Hybrid Systems

(nach Fields und Song, 1989; Gyuris *et al.*, 1993)

Bei dem Hefe-Zwei-Hybrid System handelt es sich um ein Gal4-basiertes System, welches den Nachweis von Proteininteraktionen auf transkriptionaler Ebene *in vivo* ermöglicht. Diese Methode kann genutzt werden, um einerseits mit dem bekannten Protein in einer Gen-Bibliothek nach Interaktionspartnern zu suchen, andererseits eine direkte Interaktion zweier Proteine nachzuweisen. Dabei wird das Beute-Gen (bait) an die Gal4-DNA-bindende Domäne (DNA-BD) fusioniert, während das andere Gen oder die cDNA als Köder (prey) fungiert. Die einzelnen cDNAs der *Drosophila* cDNA-Bank befinden sich im pACT2-Vektor und sind an die DNA-Aktivierungsdomäne (DNA-AD) fusioniert. Da eine cDNA-Bank durch reverse Transkription der mRNA eines Organismus gewonnen wird, hängt die Präsenz eines Genes von der mRNA-Menge, dem Gewebe und dem Entwicklungszustand ab. Demzufolge sind in einer cDNA-Bank alle cDNAs der Fruchtfliege vorhanden, jedoch in unterschiedlicher Kopienzahl. Es ist daher entscheidend, eine möglichst hohe Anzahl unabhängiger Klone zu screenen (1×10^6), um mindestens eine Kopie jedes Genes zu finden. Für das Hefe-Zwei-Hybrid System wird ein Hefestamm (AH109 oder EGY48) mit den zuvor hergestellten Plasmiden, welche für die Fusionsproteine kodieren, transformiert. Dieser besitzt einen Promotor, welcher sich aus einer UAS (upstream activating sequence) und einer TATA-Box zusammensetzt. Werden AD und DNA-BD räumlich voneinander getrennt, bleibt der Promotor inaktiv. Interagiert das Beute-Protein mit dem Köder-Fusionsprotein, so werden DNA-BD und AD in unmittelbare Nähe gebracht. Dabei bindet der Gal4 Transkriptionsfaktor an die UAS-Erkennungssequenz des Promotors, wodurch es zur Aktivierung der Transkription von stromabwärts befindlichen Reportergenen kommt (bspw. *ade2*, *his3*, *mel1*, *leu2*, *LacZ*) (Abb. 5.2). Die Aktivität der Reportergene wird durch das Wachstum auf Selektionsmedien, sowie über eine Enzymaktivität ermittelt. Die Hydrolyse von X-Gal zu Galaktose und ein blauer wasserunlöslicher Indigo-Farbstoff indizieren die Aktivität des *LacZ*-Gens.

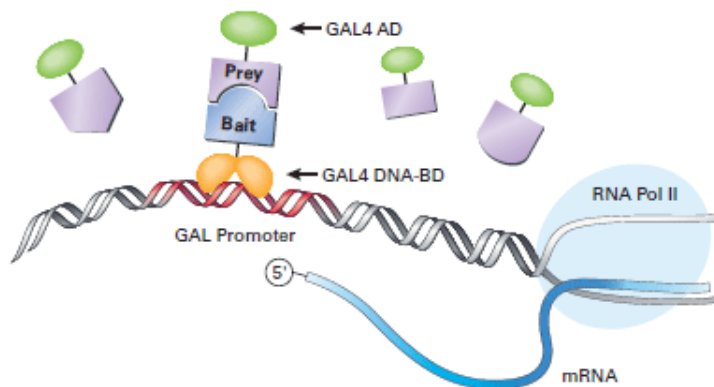


Abb. 5.2: **Das Prinzip des Hefe-2-Hybrid Systems.** Das Beuteprotein (Bait) ist mit der Gal4-bindenden Domäne fusioniert. Das Köder-Protein (Prey) fusioniert mit der Gal4-Aktivierungsdomäne. Diese werden getrennt voneinander exprimiert. Bei einer Interaktion der beiden Proteine, werden die AD und BD-Domänen im Zellkern der Hefezellen in unmittelbare Nähe gebracht und der Gal4-Promotor aktiviert, was eine Transkription von dahinter liegenden Reportergenen nach sich zieht (übernommen aus MATCHMAKER™ Gold Yeast Two-Hybrid User Manual).

5.3.16.B Herstellung von Hefenährmedien

Der Hefestamm wird in einem Glycerinstock bei -80°C gelagert. Um eine Arbeitskultur herzustellen, wird mit einem sterilen Zahnstocher etwas von der Kultur abgekratzt und auf YPD-Vollmedium Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgt bei 30°C für 3-6 Tage, anschließend kann die Platte für drei bis vier Wochen im Kühlschrank gelagert werden.

Soll auf bestimmte Wachstumseigenschaften selektioniert werden, so werden die mit beiden Expressionsvektoren transformierten Hefezellen auf verschiedenen Mangelmedien ausplattiert. Als Basis für diese Selektionsmedien wird ein synthetisches Drop Out (DO) Medium verwendet, welches essentielle Aminosäuren, sowie Purin- und Pyrimidinbasen enthält. Da dem Selektionsmedium Aminosäuren fehlen, die die Zellen durch die Aktivierung von Reportergenen selbst herstellen sollen, kann so auf das Wachstum selektioniert werden. Das Induktionsmedium zeichnet sich durch die Abwesenheit einer zusätzlichen Aminosäure (Adenin oder Leucin) aus. Der zusätzlich zugefügte Marker für Enzymaktivität (X- α -Gal oder X- β -Gal) färbt bei einer Proteininteraktion die Kolonien blau, was auf der Aktivierung des *LacZ*-Gens beruht. Zusätzlich wird den Medien eine Zuckerlösung als Kohlenstoffquelle zugegeben. Da es sich um feste Agarmedien handelt, werden 2 % (w/v) Agar zugefügt.

5. METHODEN

5.3.16.C Transformation der Plasmid-DNA in die Hefezellen nach der Lithiumacetat Methode, um eine direkte Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen

(nach Ito *et al.*, 1983; Gietz *et al.*, 1992)

Eine frische Hefekultur, die während ihrer logarithmischen Wachstumsphase geerntet wird, wird mittels Lithiumacetat chemisch kompetent gemacht. Dadurch wird die Aufnahme der Fremd-DNA ermöglicht.

Zunächst werden zwei bis drei Hefekolonien in 50 ml YPDA-Vollmedium gelöst und ü.N. schüttelnd bei 30°C inkubiert. Dabei sollte die Inkubationszeit 16 Stunden nicht überschreiten. Mit dieser Zellkultur werden 300 ml YPDA-Vollmedium auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 inokuliert und erneut für ca. 3 Std bei 30°C schüttelnd inkubiert. Um eine möglichst hohe Transformationseffizienz zu erreichen, sollte die OD₆₀₀ während dieser Zeit auf 0,4 – 0,6 ansteigen. Die Zellen werden durch den 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 2000 rpm geerntet und das Pellet anschließend mit sterilem dH₂O gewaschen. Um die Hefezellen kompetent zu machen, wird das Zellpellet in 1,5 ml 1xTE/LiAc (1 M) gelöst.

In der Zwischenzeit werden die einzelnen Transformationsansätze vorbereitet. Dazu werden jeweils 2-3 µg der zwei zu testenden Plasmide in einem 1,5 ml Reagiergefäß zusammengefügt und 100 µg denaturierte Lachssperma-DNA zugegeben. Anschließend werden 100 µl der kompetenten Hefezellen mit dem DNA-Ansatz vermischt. Nach der Zugabe von 600 µl PEG/LiAc-Puffer erfolgt eine 30-minütige Inkubation bei 30°C auf dem Schüttler (250 rpm). Danach werden 70 µl DMSO zugegeben und für 15 min bei 42°C inkubiert, um die Zellwände zu stabilisieren. Die Zellen werden für 2 min auf Eis gestellt und bei 2000 rpm pelletiert. Das Pellet wird mit sterilem dH₂O gewaschen und nach dem wiederholten Zentrifugationsschritt in 150 µl 1x TE oder dH₂O aufgenommen. Der gesamte Ansatz wird auf Selektionsplatten ausplattiert und für 4-5 Tage bei 30°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien haben während der Transformation die beiden Plasmide aufgenommen und werden auf Induktionsplatten überstrichen. Nach 3-4 Tagen Inkubation kann die Proteininteraktion ausgewertet werden. Dabei deutet das Wachstum, sowie die Blaufärbung der Klone (wird durch die Enzymaktivität der α- bzw. β- Galaktosidase induziert) auf eine Proteininteraktion hin.

5.3.16.D Transformation der Hefezellen für einen Screen

Ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen wird durchgeführt, um potentielle Interaktionspartner eines Proteins, dessen Funktion untersucht wird, zu ermitteln. Dazu werden 150 ml YPDA-Vollmedium mit wenigen Hefekolonien inokuliert und ü.N. bei 30°C und 220 rpm inkubiert.

5. METHODEN

Am nächsten Tag werden mit dieser Zellkultur 1 l YPDA-Vollmedium angeimpft und weitere 3 Std schüttelnd bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit soll die OD₆₀₀ von der ursprünglichen ca. 0,2 auf 0,4-0,6 ansteigen. Die Zellsuspension wird für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und anschließend mit sterilem dH₂O gewaschen. Dem Pellet werden 8 ml 1x TE/LiAc (1 M) zugefügt und vorsichtig resuspendiert. Der Transformationsansatz wird in einem 500 ml Kolben angesetzt. Dazu werden ca. 1 µg des Konstrukts (pGBKT7-*rac1V12* oder pGBKT7-*rac2V12*) und ca. 0,5 µg des pACT2-cDNA-Bank Konstrukts, sowie 20 mg denaturierte Lachssperma-DNA mit den Zellen gemischt. Anschließend werden 60 ml des PEG/LiAc Puffers in den Ansatz gegeben und für 30 min bei 250 rpm inkubiert. Danach erfolgen die Zugabe von 7 ml DMSO und die Inkubation bei 42°C für 15 min. Die Zellsuspension wird für 2 min auf Eis gestellt und bei 2000 rpm für 3 min pelletiert. Das Pellet wird mit dH₂O gewaschen und in 10 ml 1x TE aufgenommen. Je 200 µl der Zellen werden auf die großen Selektionsplatten (SD -His/-Leu/-Trp) ausplattiert und für 4-5 Tage bei 30°C inkubiert. Nach dieser Zeit werden die gewachsenen Kolonien mehrfach auf Induktionsplatten (SD -Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal) überstempelt. Bei den positiven Klonen wird durch die Interaktion der Proteine das *mel1*-Reportergen aktiviert, dessen Genprodukt α-Galactosidase eine blaue Färbung erzeugt. Anschließend werden die positiven Klone auf YPD-Platten überstrichen. Dies dient einerseits der Vermehrung der Hefezellen, andererseits kann auf die Aktivierung des *ade2* Reportergens selektioniert werden. Die falsch-positiven Klone verfärben sich auf dem YPD-Medium rosa.

5.3.16.E Isolation der Plasmid-DNA aus den positiven Hefeklonen

Zur Isolierung der DNA aus den Hefezellen wird das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ des Herstellers Qiagen verwendet. Dazu wird eine ca. 1 cm² große Fläche der Hefekolonien mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und in 250 µl Puffer P1 (+RNAse) resuspendiert. Der Suspension wird eine Spatelspitze Glasperlen zugegeben und für 10-20 min auf dem Vibratex-Gerät geschüttelt. Dieser Vorgang begünstigt mechanisch die Zerstörung der Zellwände. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und 250 µl P2-Lysepuffer zugefügt. Während der 5-minütigen Inkubation bewirkt der P2-Puffer die chemische Zellwandzerstörung. Nach der Zugabe von 350 µl P3-Neutralisierungspuffer werden die Zelltrümer bei 13000 rpm pelletiert, der klare Überstand auf die Säulchen geladen und erneut zentrifugiert. Durch weitere Zentrifugationsschritte bei 13000 rpm für 1 min wird das Säulchen mit 750 µl PE-Waschpuffer gewaschen, getrocknet und die gebundene DNA durch Zugabe von 20 µl EB-Elutionspuffer eluiert.

Mit der isolierten Plasmid-DNA werden chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert und die DNA erneut aus den Zellen re-isoliert. Diese Plasmide werden analysiert. Durch einen

5. METHODEN

Verdau mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI ist es möglich, anhand von Restriktionsmuster die gleichen Inserts zu ermitteln und diese zu eliminieren. Die übrigen Klone werden unter Verwendung des 3'AD- Primers sequenziert.

5.4 Zellkulturexperimente an der *Drosophila* Schneiderzelllinie SL2

5.4.1 Haltung und Aussäen der Schneiderzellen (SL2)

Die Schneiderzellen aus *Drosophila melanogaster* Embryonen erlauben eine einfache Handhabung, da sie sich bei 25-28°C halten lassen und im Eppendorfgefäß im gefrorenen Zustand geliefert werden können. Das Gefriermedium enthält 1×10^7 Zellen pro ml. Da dieses Medium Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel enthält, werden die Zellen nach dem Auftauen bei 37°C und 30-minütiger Inkubation in 5 ml Insektenmedium bei 1000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Dies erlaubt das Entfernen des für die Zellen toxischen DMSO. Anschließend werden die Zellen in 5 ml Insektenmedium aufgenommen und in eine kleine Kulturflasche gegeben.

Zur Vermehrung der Zellen werden 1×10^6 Zellen/ml ausgesät. Da es sich um Suspensionszellen handelt, die nicht stark adhären sind, müssen diese nicht trypsinisiert werden. Die dicht bewachsene Kultur wird vom Boden abgelöst und zur Bestimmung der Zellzahl 1:10 verdünnt. Nun werden 10 µl der Zellsuspension auf eine Hälber-Zellkammer gegeben, und die Zellzahl bestimmt. Für die Verdünnung bedient man sich der folgenden Formel: Mittelwert der vier ausgezählten Quadrate * 10 (Verdünnungsfaktor) * 100 * 10^3 (Kammerfaktor). Nachdem die Zellsuspension verdünnt und ausgesät wurde, erfolgt eine Inkubation bei 25°C bis zur Transfektion der Zellen am folgenden Tag.

5.4.2 Transfektion der SL2-Zellen

Als Transfektionsmethode wird die Lipotransfektion gewählt, da hier DNA mit Hilfe von Liposomen endozytotisch in die Zelle eingebracht werden kann und die Methode somit zellschonend ist. Bei dem verwendeten Lipid-Reagenz handelt es sich um TransFektin, welches im Verhältnis von 2:1 zu der benötigten DNA eingesetzt wird. Dabei sind die Richtlinien des Herstellers Biorad zu beachten. Um die Transfektion vorzubereiten, werden zunächst pro Ansatz (well) 0,5 µg DNA (hier: pUAST-Vektor) und 0,5 µg act GAL4 (konstitutiver Promotor) in 50 µl serumfreies Medium gegeben. Parallel dazu werden 3 µl TransFektin mit 50 µl serumfreiem Medium verdünnt. Nach dem Vermischen der TransFektin- und der DNA-Lösung, wird der Ansatz für 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird das Medium in den well-Platten erneuert und 100 µl des DNA-

5. METHODEN

TransFektin-Gemisches auf die Zellen gegeben. Diese werden dann für 48 Stunden bei 25°C inkubiert.

Parallel zu der beschriebenen TransFektin- Methode wurde das Transfektionsreagenz FuGENEHD des Herstellers Promega verwendet. Das Reagenz gewährleistet das Eindringen der DNA in eine Vielfalt von Zelllinien auf nicht-liposomaler Ebene. Weitere Vorteile sind eine hohe Transformationseffizienz, sowie niedrigere Toxizität. Zum Transformationsvorgehen wird das Reagenz zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend werden pro Ansatz 98 µl des vorgewärmten Mediums sowie 2 µl DNA (1 µg/µl) zusammen pipetiert und kurz gevortext. In einem Verhältnis von 3:1 wird das FuGENEHD Reagenz zugefügt (6 µl). Nach einem kurzen Schnippen wird der Ansatz für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt auf die Zellen gegeben. Dabei ist es nicht notwendig, das Medium nochmal zu wechseln. Zu beachten ist, dass das Transfektionsreagenz nicht mit der Wand der 24-well-Platte in Berührung kommt.

5.4.3 Fixierung der SL2-Zellen und Antikörperfärbung

Zur Fixierung der Zellen wird eine neue 24 well Platte mit Glasplättchen bestückt. Diese werden mit 200 µl Concanavalin A beschichtet und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beschichtung bewirkt, dass die Zellen adhärenter werden und sich ausbreiten, wodurch diese größer erscheinen. Zu den Zellen werden 500 µl frisches Schneider-Medium gegeben. Nach der Abnahme von Concanavalin A werden 500 µl der Zellsuspension auf die Glasplättchen der neuen well Platte gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese bewirkt die Anheftung der Zellen an die Glasplättchen. Anschließend werden 500 µl 4 % F-PBS zugegeben. Nach 15 min wird zweimal für jeweils 5 min in PBS gewaschen. Die Permeabilisierung ermöglicht das Eintreten der Antikörper in die Zelle und erfolgt durch Zugabe von 0,5 % Triton/PBS für 2,5 min. Nach zwei Waschschritten mit PBS werden die Zellen für 30 min in 3 % BSA/PBS inkubiert, was das Abbinden unspezifischer Bindestellen bewirkt. Anschließend können die Zellen entweder direkt mikroskopiert oder einer Antikörperfärbung unterzogen werden. Trägt das DNA-Konstrukt einen Fluoreszenz-Tag, kann dieser direkt nachgewiesen werden; hier wird lediglich eine Phalloidin-Hoechst-Färbung zur Markierung des Aktin-Zytoskeletts und der Zellkerne benötigt. Dazu werden die beschichteten Glasplättchen aus der well-Platte genommen und in einem 30 µl Tropfen mit der Zellschicht nach unten in einer Feuchtkammer mit Phalloidin-TRITC (1:50) und Hoechst (1:200) für 15 min inkubiert. Ist eine Antikörperfärbung notwendig, werden die Glasplättchen nach dem Blocken im PBS und anschließend im Wasser gewaschen und einer Inkubation mit dem ersten Antikörper für 1-2 Std bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer

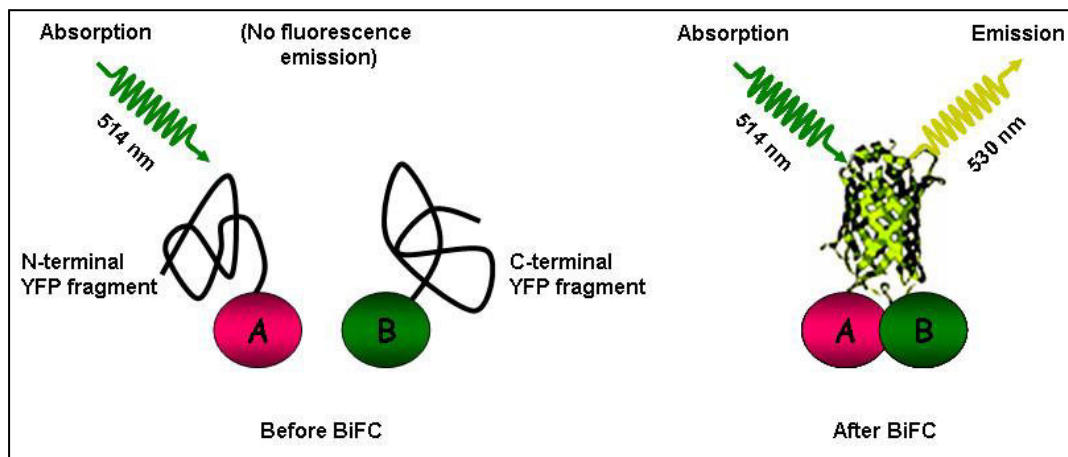
5. METHODEN

unterzogen. Nach den folgenden Waschschritten in PBS und Wasser wird mit dem zweiten Antikörper für 1 Std inkubiert. Anschließend wird auch der zweite Antikörper mit PBS abgewaschen und in einem 30 µl Tropfen Phalloidin-TRITC (1:20) und Hoechst (1:200) für 15 min inkubiert. Die Glasplättchen werden nun kurz mit PBS und abschließend mit ddH₂O gespült und in 10 µl Fluoromount auf Objektträger eingebettet.

5.4.4 Nachweis der Protein-Protein Interaktion *in vivo* mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Assay)

(nach Kerppola, 2008, Gohl *et al.*, 2010)

Die Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) erlaubt eine Visualisierung von Protein-Protein Interaktionen in lebenden Zellen. Dieses Verfahren basiert auf Komplementation von zwei Fragmenten eines Fluoreszenzproteins, wie z.B. GFP oder YFP. Das Prinzip des BiFC ist mit dem Hefe-Zwei-Hybrid System (siehe 5.3.16.A) verwandt. Üblicherweise werden beide Methoden gleichzeitig verwendet um genauere Aussagen über eine Protein-Protein Interaktion zu treffen. Dabei sind die beiden Fragmente jeweils an die potentiellen interagierenden Proteine gekoppelt. Im Fall eines YFP-Fluorochroms besteht das gespaltene Protein aus den ersten (N-terminalen) 155 Aminosäuren bzw. den letzten (C-terminalen) 83 Aminosäuren. Kommt es zu einer Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine, so werden die C- und N-terminalen Fragmente zu einem intakten Fluoreszenzprotein zusammengelagert, wodurch ein fluoreszierender Komplex erzeugt wird (Abb. 5.3). Dieses kann mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops in Form eines Signals nachgewiesen werden. Zusätzlich kann die Lokalisation der interagierenden Proteine innerhalb der Zelle abgeschätzt werden. Dazu werden die Zellen nach der Fixierung lediglich einer Phalloidin-Hoechst-Färbung, die das zelluläre Zytoskelett und die Zellkerne sichtbar macht, unterzogen (siehe 5.4.3) und können direkt ausgewertet werden.



5. METHODEN

Abb. 5.3: **Schematische Darstellung des Prinzips einer Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.** Die Proteine A und B sind an die N- und C-terminalen Fragmente des YFP-Proteins gekoppelt. Kommt es zu keiner Interaktion der beiden Proteine, so sind die Fluorochrom-Hälften nicht- funktional. Im Fall einer Protein-Protein Interaktion werden die beiden Fragmente in unmittelbare Nähe gebracht, wodurch eine Komplementation zu einem intakten Fluoreszenzprotein ermöglicht wird (übernommen aus Bhat *et al.*, 2006).

6. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit ist in vier Teile gegliedert. Der erste Punkt befasst sich mit dem signalübertragenden Adaptorprotein Dock, der die Zelladhäsion und die Arp2/3-vermittelte Aktin-Polymerisation verbindet. Nach der erfolgten Zelladhäsion ist die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes von besonderem Interesse. Demnach wird im weiteren Ansatz das monomer-bindende Protein Profilin/Chic als eine zusätzliche Komponente, die an der Aktin-Bildung beteiligt ist, charakterisiert. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der bisher wenig untersuchten Scar/Wave-abhängigen Aktin-Polymerisation. Interessant ist, dass der Scar-Komplex von den redundant wirkenden Rho GTPasen Rac1 und Rac2 aktiviert wird, deren Regulation hier näher analysiert wird. Im Zusammenhang mit der dynamischen Plaque-Auflösung wird im letzten Teil dieser Arbeit sich mit dem Prozess der Depolymerisation nach dem Einsatz des Fusionsprozesses beschäftigt.

6.1 Die Arp2/3-abhängige Aktin-Polymerisation basiert auf der genetischen Interaktion von Vrp1/Wip mit dem Adaptorprotein Dock, wird jedoch auch durch andere Faktoren reguliert

Die Voraussetzung für die Myoblastenfusion in *Drosophila* ist die heterologe Zelladhäsion zwischen FCs und FCMs, gefolgt von der lokalen F-Aktin Akkumulation und der Integration der FCMs in die wachsende Myotube. Eine wichtige Frage ist dabei, wie das Signal von den Adhäsionsmolekülen der IgSF-Proteine übertragen wird, um die F-Aktin-Plaque-Formierung zu initiieren. Bisherige Koimmunopräzipitationsstudien konnten Crk als ein FCM-spezifisches SH2-SH3-Adapterprotein aufdecken. Crk ist einerseits in der Lage an die intrazelluläre Domäne von Sns zu binden, andererseits interagiert es mit Vrp1/Wip (Galetta *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007). Ein anderer kürzlich im Bezug auf die Myoblastenfusion analysierter SH2-SH3-Adaptor ist das Nck-homologe Protein Dock. Es konnte bewiesen werden, dass das in beiden Myoblastentypen exprimierte Dock mit den Arp2/3-Aktivatoren Scar, Wasp und Vrp1/Wip sowohl auf genetischer, als auch auf biochemischer Ebene interagiert. Des Weiteren bindet es an die intrazelluläre Domäne aller bekannten Ig-Proteine, die die Erkennung und Adhäsion zwischen FCs und FCMs steuern (Kaipa *et al.*, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde auf die Dock-abhängige Signalvermittlung an die Aktin-Polymerisationsmaschinerie fokussiert. Daher wird hier die genetische Interaktion zwischen *dock* und *vrp1/wip* vorgestellt. Die homozygote Embryonen des *dock*-Nullallels zeigen keine Fusionsstörungen (Abb. 6.1, A). Dagegen weist die *vrp1/wip*-Nullmutation deutliche Fusionsdefekte auf (Abb. 6.1, B) (Berger *et al.*, 2008, Massarwa *et al.*, 2007). Bereits vor Beginn dieser Arbeit existierten die *vrp*^{f06715}, *dock*⁰⁴⁷²³ Doppelmutanten, in denen es im Vergleich zu den Einzelmутanten zu einer signifikanten Intensivierung der Fusionsdefekte

kommt (Abb. 6.1, C). Im Rahmen meiner Arbeit wurde auf zwei Fragestellungen eingegangen: Wie weit kommen die Doppelmutanten während des Fusionsprozesses und inwiefern werden dabei die FCM-spezifischen Aktin-Plaques noch gebildet? Demzufolge wurde zunächst mit Hilfe des *Mef2* (Myocyte-specific enhancer factor 2)-Antikörpers analysiert, inwiefern in diesen doppelmutanten Embryonen noch Fusionen der Myoblasten stattfinden. *Mef2* ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Muskelentwicklung steuert und als Antikörper die Kerne der Muskelzellen markiert. Die in Abb. 6.1, D dargestellte Kernmarkierung verweist auf die Präsenz multinukleärer Myotuben mit der geschätzten maximalen Kernzahl von fünf oder sechs. Da die Ausbildung eines F-Aktin-Plaques an der Zell-Zell-Kontaktstelle ein charakteristisches Merkmal der Zellerkennung und Signalweiterleitung darstellt, wurden die homozygoten Doppelmutanten mit Hilfe einer Phalloidin-Färbung auf das Vorhandensein der Aktin-Plaques analysiert. Phalloidin ist ein Toxin der grünen Knollenblätterpilze, dessen Eigenschaft, irreversibel an F-Aktin zu binden, man sich zunutze macht um Aktin-Zytoskelett anzufärben. In den wildtypischen Embryonen wird der Aktin-Plaques an der Kontaktstelle zwischen FCMs und der wachsenden Myotube gebildet (Abb. 6.1, E-F, Pfeile). Auch in den *dock*⁰⁴⁷²³, *vrp*¹⁰⁶⁷¹⁵ Doppelmutanten sind die Plaques noch sichtbar und erscheinen auf der Seite der adhärierenden FCMs. Weiterhin ist es anzunehmen, dass aufgrund der expandierten Zell-Zell-Kontaktstelle, die Auflösung der Plaques sowie zytoplasmatische Kontinuität möglich ist (Abb. 6.1, G-H, Pfeile). Dies lässt darauf schließen, dass die Signalweiterleitung an das Aktin-Zytoskelett nicht ausschließlich von Dock abhängt. Diese Ergebnisse wurden in Kaipa *et al.* (2013) publiziert.

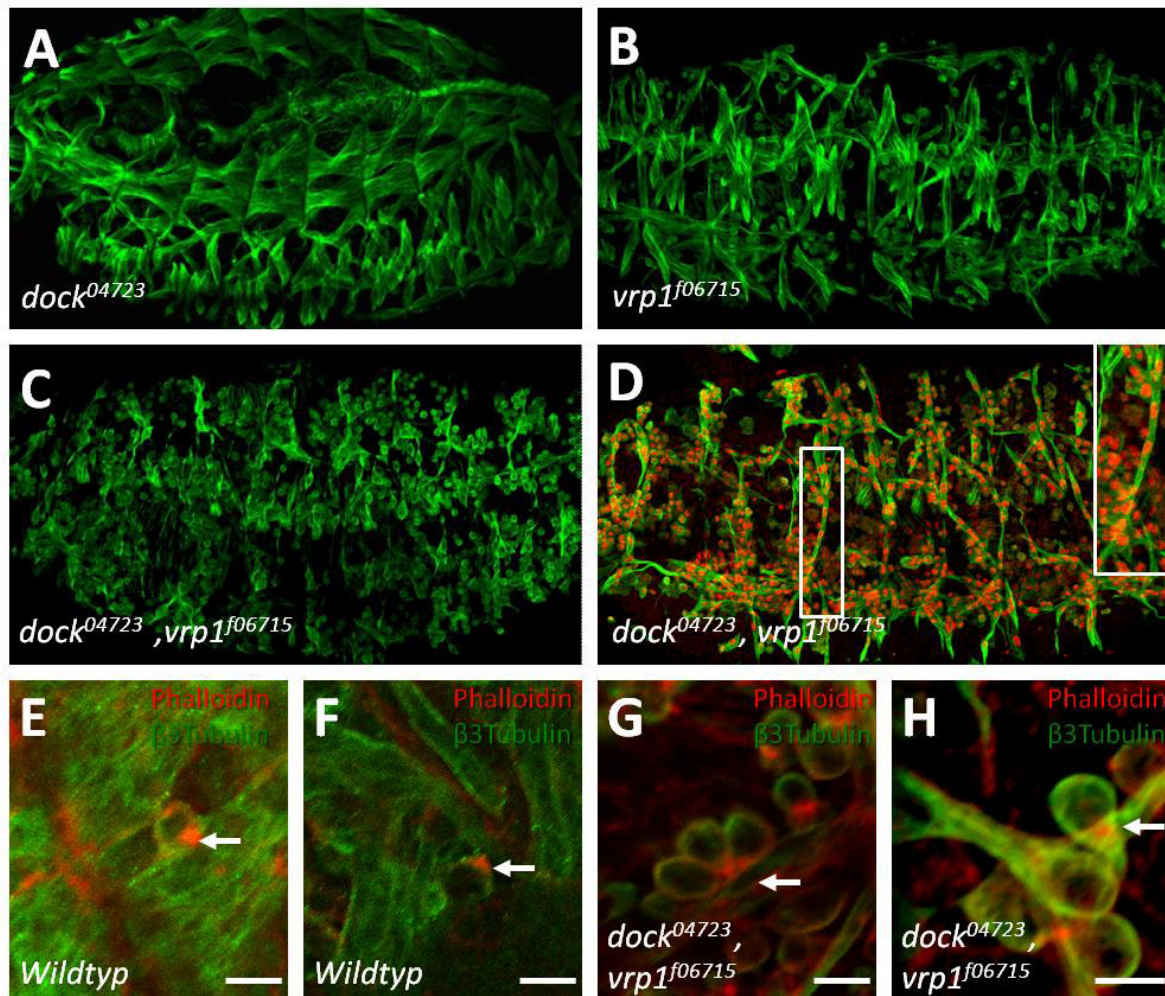


Abb. 6.1: **Die stark zerstörten *dock, vrp1* Doppelmutanten kommen bei der Fusion noch bis zu der Plaque-Bildung.** A-C: Laterale Ansicht der sich im Stadium 16 befindenden Embryonen, deren Muskulatur mittels β 3-Tubulin angefärbt worden ist. A: *dock*⁰⁴⁷²³ zeigt keine Fusionsstörungen. Die bereits vorhandene Defekte in der *vrp*^{f06715}-Mutante (B) werden in der *dock*⁰⁴⁷²³, *vrp*^{f06715}-Doppelmutante deutlich verstärkt (C). D: anti-*Mef2*-Färbung (rot) an der Doppelmutante indiziert die Präsenz von mehrkernigen Myotuben. Der markiert Bereich ist oben rechts vergrößert dargestellt. E-H: Phalloidin-Färbung an wildtypischen (E-F) und Doppelmutanten (G-H). Trotz der starken Fusionsdefekte werden die F-Aktin-Plaques auf der Seite der FCMs noch gebildet und sind mit der wildtypischen Form vergleichbar (Pfeile). Maßstabsbalken: 5 μ m.

Interessanterweise haben Arbeiten von Richardson *et al.* (2007) gezeigt, dass die F-Aktin-Akkumulation in zahlreichen untersuchten Mutanten, die die Arp2/3-basierte Aktin-Polymerisation beeinträchtigen, noch stattfindet. Anhand der Größenunterschieden konnten diese in drei Gruppen unterteilt werden (Richardson *et al.*, 2007). Nur für die *scar, vrp1* Doppelmutanten, welche einen kompletten Fusionsstopp aufweisen (Berger *et al.*, 2008) konnte gezeigt werden, dass es zu einer verminderten Plaque-Größe kommt (Sens *et al.*, 2010). Um dies zu verifizieren wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine Phalloidin-Färbung an *wip*^{f06715}, *scar* ^{Δ 37}-Doppelmutanten durchgeführt. Diese zeigt die vorhandenen Aktin-Plaques an der Zell-Zell-Kontaktstelle, lässt jedoch keine Aussage über deren Größe machen (Abb. 6.2).

6. ERGEBNISSE

Interessant ist, dass die Akkumulierung des F-Aktins nicht in allen adhärierenden FCMs beobachtet werden konnte, was eine minimierte Aktin-Polymerisation in diesen Doppelmutanten annehmen lässt (Abb. 6.5, B, Pfeilköpfe). Dies zeigt, dass sowohl die Wasp-, als auch Scar/Wave-abhängige Aktin-Polymerisation wichtig für die Plaque Bildung ist, und dass es nur zur einer Reduktion der Plaques kommt, wenn beide Signalwege gestört sind. Die Tatsache, dass Aktin-Plaques noch gebildet werden, lässt vermuten, dass noch weitere Signalwege bzw. Komponente an deren Bildung beteiligt sind.

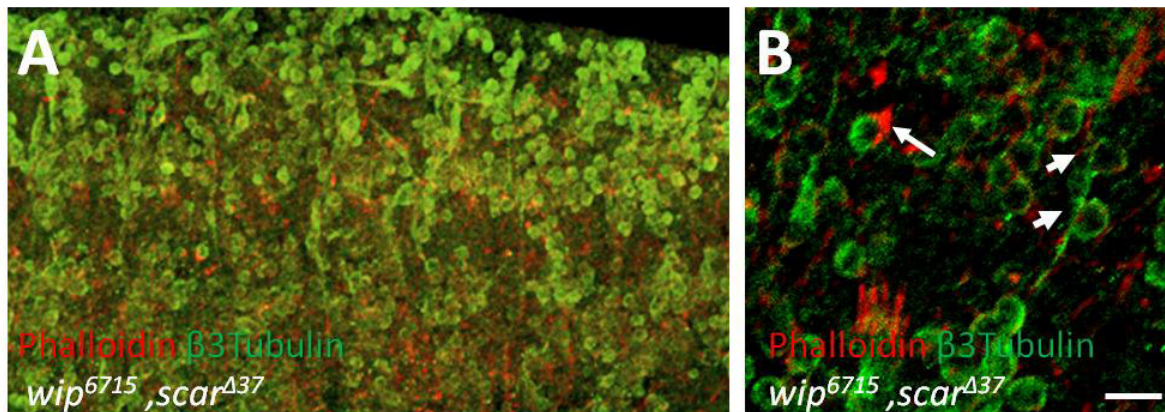


Abb. 6.2: Die *wip⁶⁷¹⁵,scar^{Δ37}*-Doppelmutanten weisen eine verminderte F-Aktin-Polymerisation auf. Die mittels β3-Tubulin (grün) sichtbargemachte Muskulatur des sich im Stadium 16 befindende Doppelmutanten-Embryos. Die zusätzliche Phalloidin-Färbung deutet die Aktin-Plaques an. B: Vergrößerte Darstellung adhärierender FCMs und deren Aktin-Akkumulation an der Kontaktstelle (Pfeil) sowie der beobachteten fehlenden Aktin-Plaques (Pfeilköpfe). Maßstabsbalken: 5 μm.

6.2 Weitere Komponente, die an der Aktin-Polymerisation beteiligt sind

Die Aktin-Polymerisation sowie die Verzweigung der Filamente scheint ein hochregulierter Prozess zu sein, der Scar/Wave und Wasp-Vrp1/Wip gesteuerte Nukleierung benötigt. Inwiefern noch weitere Komponenten an der Aktin-Bildung während der Myoblastenfusion beteiligt sind, wird im Weiteren anhand des Monomer-bindenden Proteins Chic untersucht.

6.2.1 Das Aktinmonomer-bindende Protein Chic interagiert auf genetischer Ebene mit den Komponenten der Arp2/3-gesteuerten Aktin-Polymerisation: *wasp*, *wip* und *scar*

Die heterologe Fusion der Myoblasten wird durch Zell-Erkennung und Zell-Adhäsion initiiert. Charakteristisch für dieses Ereignis ist die Lokalisation der IgSF-Proteine in einer ringförmigen Struktur, den FuRMAS. Durch die Signalweiterleitung kommt es im Zentrum der FuRMAS zur lokalen Akkumulation des verzweigten F-Aktins (Kesper *et al.*, 2007). Diese Aktin-Plaques werden dominierend auf der Seite der FCMs gebildet, während die FCs eine dünne F-Aktin Schicht an der Stelle des Zellkontakts formen (Sens *et al.*, 2010; Haralalka

et al., 2011). Die Arp2/3-abhängige Entstehung von verzweigtem F-Aktin wird durch die nukleationsfördernden Faktoren Scar/Wave (Berger *et al.*, 2008; Richardson *et al.*, 2007) und Wasp (Gildor *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Massarwa *et al.*, 2007; Schäfer *et al.*, 2007) reguliert. Neben diesen Regulatoren kontrollieren weitere Aktinmonomer-bindende Proteine die Assemblierung der Filamente und tragen zur Dynamik dieser Strukturen bei. Eines dieser Proteine ist das *Drosophila* Profilin Orthologe Chic, welches in zahlreichen Aktin-basierten Prozessen involviert ist. Die Rolle des *chic*-Gens während der Myoblastenfusion der Fruchtfliege ist zurzeit noch unerforscht. Die in meiner Masterarbeit durchgeführte *in situ*-Hybridisierung mit einer *chic*-spezifischen mRNA-Sonde deutet auf eine maternale Komponente hin. Weiterhin ist in den frühen Stadien eine ubiquitäre Transkriptlokalisation nachzuweisen, während in den fusionsrelevanten Stadien eine Mesoderm-spezifische Transkription erkennbar ist (Masterarbeit, T.Trinkewitz, 2010). Dieses Expressionsmuster deutet darauf hin, dass *chic* eine Funktion während der Muskelbildung zuteilwird. Allerdings zeigen die *chic*²²¹ homozygote Nullmutanten (Verheyen und Cooley, 1994) keine Fusionsdefekte (Bachelorarbeit, David Breier, 2007). Es ist aber bekannt, dass die F-Aktin assemblierende Funktion von Chic durch die Interaktion mit prolinreichen Domänen einiger Proteine verstärkt wird (Reinhard *et al.*, 1995; Suetsugu *et al.*, 1998). Die an der Elongation des schnell wachsenden Filamentendes beteiligten Proteine Scar/Wave, Wasp und Vrp1/Wip weisen prolinreiche Bereiche auf, an die Profilin binden kann. Um die genetische Interaktion dieser Gene zu verifizieren, wurden vor Beginn dieser Arbeit *chic,wip* und *chic,scar* Doppelmutanten generiert (Prof. S. Önel und Dr. V. Groth). Im Rahmen meiner Masterarbeit wurden von mir zusätzlich *chic,wasp*, und *chic;Arp3* Doppelmutanten hergestellt. Die *wip*^{D30}-Nullmutanten weisen starke Fusionsstörungen auf und in elektronenmikroskopischen Analysen sieht man, dass der Fusionsvorgang während des Membranzusammenbruchs stoppt (Massarwa *et al.*, 2007). Dieser Fusionsphänotyp wird in den *chic*²²¹,*wip*^{D30}-Doppelmutanten verstärkt, was auf eine starke genetische Interaktion hindeutet (Abb. 6.3, A-B,D). Die Embryonen der *scar*^{A37}-Mutante weisen geringe Defekte auf, was auf eine noch maternal vorhandene Proteinexpression zurückzuführen ist. In den *chic*²²¹, *scar*^{A37}-Doppelmutanten werden demnach noch erkennbar mehr Muskeln gebildet (Abb. 6.3, A,C,E). Das *wasp*³-Allel, bei dem nur die VCA-Domäne deletiert ist, zeigt keine Fusionsdefekte und erzeugt zusammen mit *chic*²²¹ nur geringe Störungen der Fusionsereignisse (Abb. 6.3, F). Die *Arp3*^{schwächling} Mutanten stoppen während des zweiten Fusionsschritts (Berger *et al.*, 2008). Bei der hier nicht gezeigten *chic*²²¹; *Arp3*^{schwächling} Doppelmutanten tritt zwar eine geringe Verstärkung des Phänotyps auf, dieser ist jedoch sehr variabel. Dies ist damit zu begründen, dass es sich bei der *Arp3*^{schwächling} Einzelmutante um eine Splice-Mutante handelt, deren Phänotyp ebenfalls variiert (Berger *et al.*, 2008). Die Ergebnisse der Untersuchung

6. ERGEBNISSE

genetischer Interaktionen deuten auf einen möglichen Einfluss von *chic* auf die Arp2/3-regulierte Aktin-Polymerisation hin. Da es sich hierbei um rezessive Gene handelt wurde im weiteren Schritt auf die Dosis-Abhängigkeit der Interaktion von *chic* mit den vorher charakterisierten Genen fokussiert. Die Begründung dieses Vorgehens liegt darin, dass in *Drosophila* die Menge des Genprodukts gewöhnlich proportional zu den Wildtypkopien des Gens im Genom ist, sodass Fliegen mit einer Genkopie nur 50% des Genprodukts haben (Kennison und Tamkun, 1988). Folglich, sollte *chic* mit beiden Komponenten der Arp2/3-vermittelten Aktin-Polymerisation interagieren, sollte die Reduktion der Gendosis der Wasp- und Scar/Wave-vermittelten Aktin-Polymerisation in homozygoten *chic* Mutanten einen Fusionsphänotyp hervorrufen. Dies würde darauf hindeuten, dass Chic sowohl eine Komponente der Wasp-, als auch Scar/Wave-vermittelten Arp2/3-Polymerisation ist. Fehlt im homozygoten *chic*²²¹ mutanten Hintergrund zusätzlich eine Kopie von *wasp* und *wip*, kommt es zu keinem Fusionsdefekt (Abb. 6.3, G), was das Wirken der Proteine in einen Signalweg annehmen lässt. Zudem könnte dieser Phänotyp mit der noch vorhandenen maternalen Komponente von *wasp* erklärt werden. Wird im homozygoten *chic*²²¹ mutanten Hintergrund ein heterozygoter *wip*^{D30} und *scar*^{Δ37} Zustand erzeugt, so kommt es zur einer Verstärkung des Muskelphänotyps im Vergleich zu den Einzelmутanten. Hierbei sind noch wenige unfusionierte Myoblasten identifizierbar (Abb. 6.3, H). Außerdem zeigt ein weiteres dosis-sensitives genetisches Experiment, dass die zusätzliche Herausnahme von einer Kopie des *wasp*- und des *Arp3*-Gens ebenfalls eine Verstärkung des *chic*-Einzelmутantenphänotyps zur Folge hat (Abb. 6.3, I).

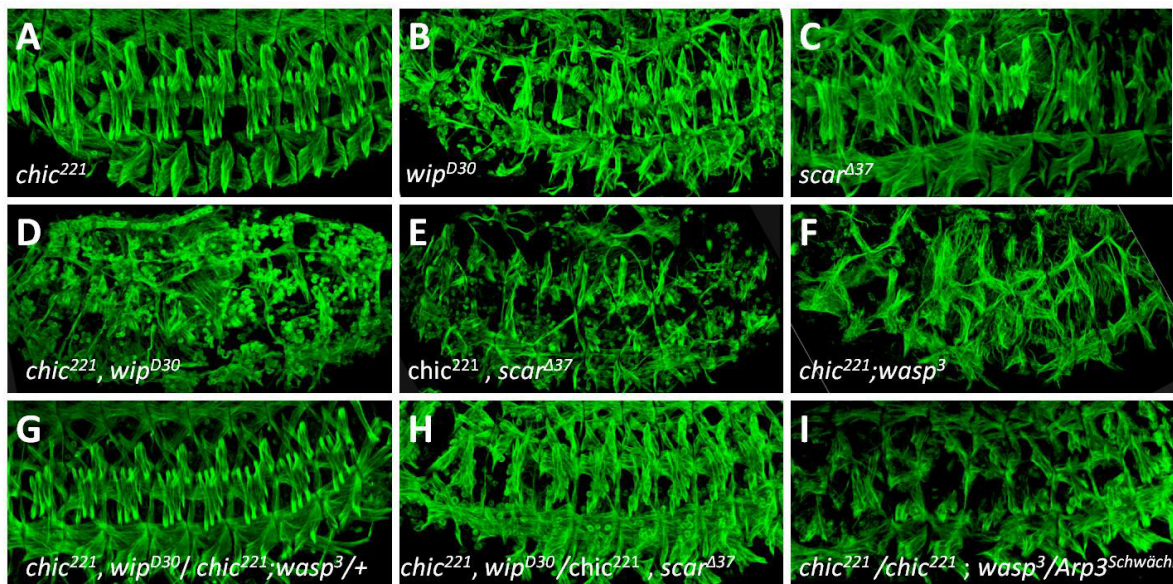


Abb.6.3: **Arp3, wip, scar und wasp interagieren mit chic auf genetischer Ebene.** A-I: Laterale Ansicht der sich im Stadium 16 befindenden Embryonen, deren Muskulatur mittels $\beta 3$ -Tubulin sichtbar gemacht wurde. Die *chic*²²¹-Einzelmутante zeigt keine Fusionsstörungen (A), *wasp*³-Einzelmутante ebenfalls nicht. Dagegen zeigt die

6. ERGEBNISSE

wip^{D30}-Nullmutante deutliche Defekte (B), während die *scar*^{A37}-Mutante nur schwache Defekte aufweist (C). Die *chic*²²¹,*wip*^{D30}-Doppelmutanten zeigen starke Störungen der Myoblastenfusion (D). Demgegenüber sind die ebenfalls starken Störungen der *chic*²²¹,*scar*^{A37} Mutanten nicht so stark ausgeprägt (E). Der *chic*²²¹,*wasp*³-Mutantenphänotyp ist der schwächste (F). Die Dosisexperimente demonstrieren, dass im homozygoten *chic* mutanten Hintergrund der heterozygote Zustand von *wip* und *scar* und auch von *wasp* und *Arp3* zu einer Verstärkung des Phänotyps führt (H-I). Die Ausnahme bildet dabei die Herausnahme von einer Kopie *wip* und *wasp*, was nicht in Fusionsdefekten resultiert (G).

Aufgrund der hergestellten Doppelmutanten und der anschließenden Tests bezüglich der dosis-sensitiven Abhängigkeit kann Chic als Komponente der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation fungieren. Da die *chic*²²¹,*wip*^{D30} Doppelmutanten die stärksten Fusionsstörungen zeigen, stellte sich die Frage, inwiefern F-Aktin in Form von Aktin-Plaques noch gebildet werden kann. Daher wurde an diesen Mutanten eine Phalloidin-Färbung zum Sichtbarmachen der Aktinstrukturen durchgeführt. Diese zeigen, dass die Plaques trotz kaum fusionierender Myoblasten in den adhärierenden FCMs noch vorhanden sind (Abb. 6.4). Daraus lässt sich schließen, dass der Fusionsdefekt nicht auf der Signalweiterleitung von der Zelladhäsion zum Aktin-Zytoskelett beruht, sondern zu einem späteren Zeitpunkt in der Fusion zustande kommt.

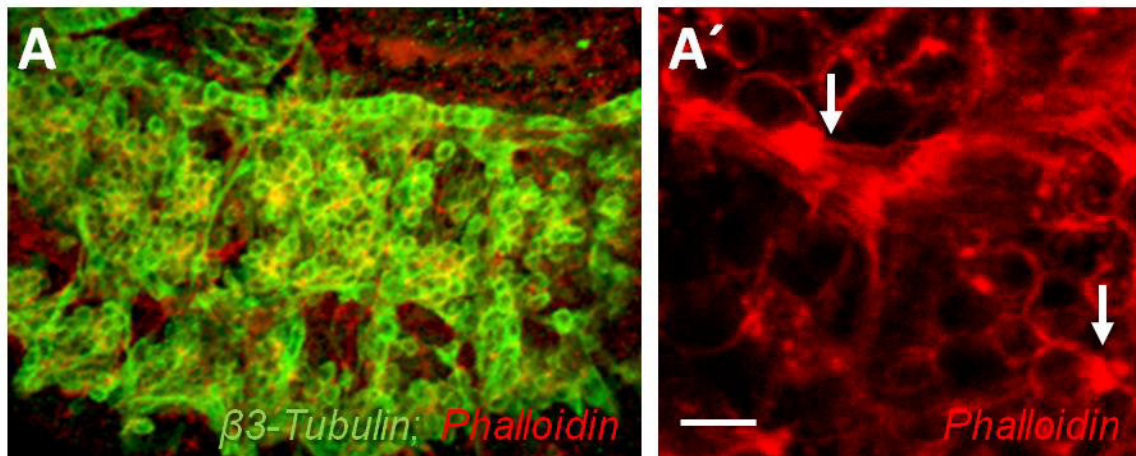


Abb. 6.4: **Formierung der Aktin-Plaques in der *chic*²²¹,*wip*^{D30}-Doppelmutante.** Die mittels Phalloidin-Färbung (rot) sichtbargemachte Aktinstrukturen. A: Ausschnitt der lateral dargestellten embryonalen Muskulatur, die mittels $\beta 3$ -Tubulin (grün) visualisiert wurde. A': Vergrößerte Darstellung der adhärierenden FCMs; Aktin-Akkumulation an der Kontaktstelle zu FCs ist deutlich erkennbar (Pfeile). Maßstabsbalken: 5 μ m.

Die beobachtete schwache genetische Interaktion von *chic* mit den Aktin-Nukleatoren *scar* und *wasp* und auch die Berücksichtigung der in Abb. 6.2 dargestellten Phalloidinfärbung an *wip*,*scar*-Doppelmutanten lässt die Beteiligung zusätzlicher Komponente an der Bildung der Aktin-Plaques vermuten. Demzufolge wird ein weiterer Aktinregulator untersucht, der strukturelle Ähnlichkeit zur Wasp-Proteinfamilie aufweist: Ena/Vasp. Da Ena/Vasp auch an

6. ERGEBNISSE

Profilin bindet wurde zudem untersucht, ob *Drosophila ena/vasp* genetisch mit *profilin/chic* während der Myoblastenfusion interagiert.

6.2.2 *chic* interagiert genetisch mit dem Aktin-Nukleator *ena/Vasp* während der Wegfindung der ventralen Muskeln und geringfügig während der Myoblastenfusion

Ein anderer hypothetischer Interaktionspartner für Profilin ist Enabled (Ena)/Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (Vasp), welcher primär als Aktin-Elongationsfaktor mit einer schwachen Nukleationsaktivität agiert (Bear *et al.*, 2002; Svitkina *et al.*, 2003). Das Protein ist in zahlreiche physiologische Prozesse involviert: während der Morphogenese, der axonalen Wegfindung oder während der Invasion von Tumorzellen. Wie Wasp und Vrp1/Wip besitzt Ena/Vasp eine konservierte, zentral liegende prolinreiche Region. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ena/Vasp in humanen Zellen als Ligand an der Seite von Profilin die Signaltransduktion zur Bildung von Aktin-Filamenten fördert (Reinhard *et al.*, 1995). Weiterhin wurde in einem Hefe-2-Hybrid-Screen für die C-terminale 243 Aminosäuren des Ena/Vasp-Proteins Chic als Interaktionspartner identifiziert (Ahern-Djamali *et al.*, 1999). Da die rezessiv-letalen *ena/vasp*-Mutationen in *Drosophila* dominierende Defekte im zentralen Nervensystem hervorrufen, beschränken sich die bisherigen Studien auf dieses embryonale Gewebe. Die Analyse der Muskulatur der *ena/vasp*-Nullmutanten deutet auf eine Funktion des Gens während der Myoblastenfusion hin. Die in Abb. 6.5, A dargestellte *ena*²¹⁰-Nullmutante zeigt nur wenige unfusionierte Myoblasten sowie starke muskuläre Wegfindungsdefekte (Doktorarbeit C. Dottermusch, 2010). Die ventralen Muskeln wachsen im Wildtyp nicht über die embryonale Mittellinie hinaus; die Mutanten weisen aber eine deutliche Überschreitung der Mittellinie auf. Um die genetische Interaktion von *chic* und *ena/vasp* während der Bildung der embryonalen Muskulatur zu untersuchen, wurden *chic*²²¹,*ena*²¹⁰ rekombinante Fliegenlinien hergestellt. Durch den Verlust der beiden Gene kommt es in den Doppelmutanten zu einer Verstärkung der Wegfindungsdefekte in Vergleich zu den *ena*²¹⁰-Einzelmutanten (Abb. 6.5, C-D, Pfeile). Die ventralen Muskeln wachsen deutlich über die Mittellinie hinaus und erreichen sogar in einigen Fällen die gegenüberliegende Seite. Zusätzlich können vereinzelt wenige unfusionierte Myoblasten beobachtet werden (Abb. 6.5, C-D, kleine Pfeile). Die beobachtete genetische Interaktion von *chic* und *ena/vasp* lässt eine duale Rolle von Ena/Vasp im Prozess der Muskelbildung vermuten: Zum Einen während der Myoblastenfusion, und zum Anderen während der Anheftung der ventralen Muskeln an die Epidermis.

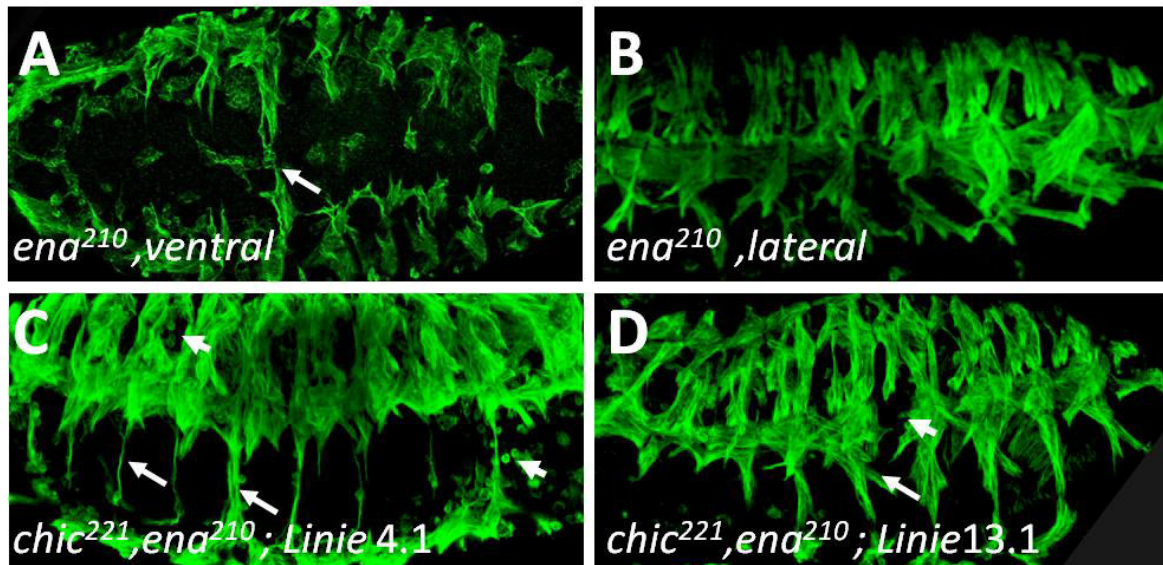


Abb. 6.5: *ena/vasp* zeigt eine genetische Interaktion mit *chic*. Die mittels β 3-Tubulin gefärbte embryonale Muskulatur der sich im Stadium 16 befindenden Embryonen. A-B: *ena*²¹⁰ mutante Embryonen zeigen Wegfindungsstörungen der ventralen Muskulatur (Pfeile). C-D: Die *chic*²²¹,*ena*²¹⁰ rekombinanten Linien weisen ein deutlich stärkeres Überschreiten der embryonalen Mittellinie durch die ventralen Muskeln auf (Pfeile) und in seltenen Fällen sind wenige unfusionierte Myoblasten sichtbar (kleiner Pfeil).

Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass Chic in beide Signalwege der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation involviert ist. Zudem scheint Chic auch mit dem Aktin-Regulator Ena/Vasp während der Muskelentwicklung zu interagieren. Die genetischen Interaktionsstudien lassen aber nur eine geringfügige Rolle von Chic und Ena/Vasp während der Myoblastenfusion vermuten.

Während über die Vrp1/Wip-Wasp-vermittelte Signaltransduktion relativ viel bekannt ist, ist die Scar/Wave-abhängige Arp2/3-Komplex-Aktivierung nur wenig untersucht. Im Speziellen ist kaum etwas über die Aktivierung des pentameren Scar-Komplexes durch die Rho GTPasen Rac1 und im Besonderen durch Rac2, die in funktioneller Redundanz wirken (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002), bekannt. Auch Rac1 ist als Interaktionspartner für Profilin/Chic beschrieben. Es soll daher in den folgenden Abschnitten zunächst der Phänotyp von *rac1*, *rac2* Doppelmutanten sowie der aktivierten und der konstitutiv-aktiven *rac1* Mutanten charakterisiert werden. Anschließend soll die Interaktion von *chic* mit *rac1* und *rac2* untersucht werden.

6.3 Analysen der Muskel-spezifischen RhoGTPasen Rac1 und Rac2 während der Muskelbildung von *Drosophila*

6. ERGEBNISSE

6.3.1 Die Schlüsselfunktion der GTPase Rac1 während *Drosophila* Myoblastenfusion wird durch die Blockade der Fusionsereignisses in den konstitutiv-aktiven und dominant-negativen induzierten Mutanten bestätigt

Rac gehört zu der Proteinfamilie der Rho GTPasen, dessen fundamentale Rolle für zahlreiche zelluläre Prozesse nachgewiesen wurde. Durch die alternierende Bindung an GTP oder GDP existiert Rac in zwei Konformationsformen und fungiert als molekularer „Schalter“ in den Signaltransduktionskaskaden. Zwei Rac GTPasen Rac1 und Rac2 scheinen während der Myoblastenfusion eine Funktion zu haben (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002). Aus den früheren Forschungsarbeiten ist bereits bekannt, dass die Mesoderm-spezifische Expression der dominant-negativen sowie konstitutiv-aktiven Form von Rac1 die Myoblastenfusion blockiert (Luo *et al.*, 1994). Um herauszufinden, inwiefern in diesen Mutanten noch Fusionen stattfinden, wurden diese anhand der *Mef2*- Kernmarkierung analysiert. Die in der Abb. 6.6 dargestellte immunohistologische Färbung an *Drosophila* Embryonen zeigt, dass die meisten Myoblasten einkernig bleiben und keine Fusionsereignisse stattfinden. In einzelnen Fällen sind jedoch mehrkernige Muskelzellen zu beobachten, sodass es nicht vollständig auszuschließen ist, dass die Myoblastenfusion in diesen Mutanten in geringem Maße vollzogen werden kann. Da in der Färbung nicht zwischen FCs und FCMs unterschieden werden kann, erweist es sich hier als schwierig eine genaue Aussage bezüglich der stattfindenden Fusionsereignisse zu treffen.

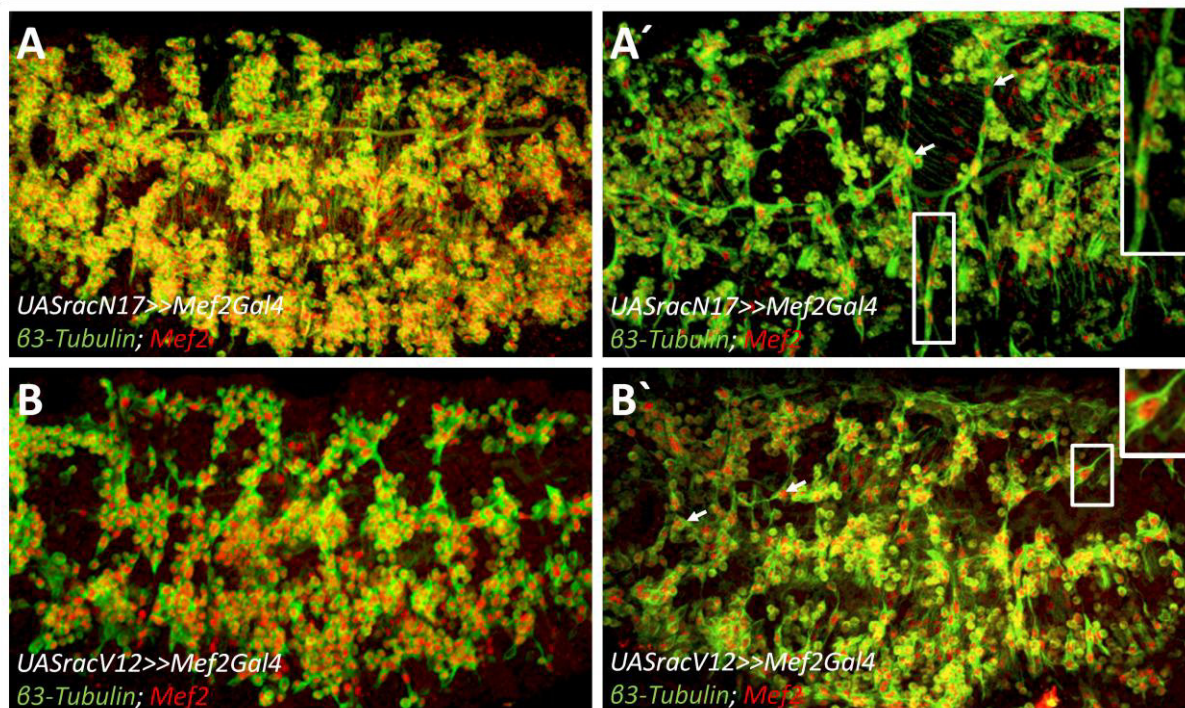


Abb. 6.6: Immunohistologische Färbung an *Drosophila racN17* und *racV12* mutanten Embryonen. Die dargestellten Embryonen befinden sich in 16-ten Entwicklungsstadium und wurden einer anti- β 3-Tubulin- (grün)

6. ERGEBNISSE

zur Markierung der Muskulatur, sowie einer anti-Mef2-Färbung (rot) zur Markierung der Muskelkerne unterzogen. Es geht hervor, dass die embryonale Muskulatur einkernig bleibt (in A' und B' mit Pfeilen markiert). Nur in einzelnen Fällen sind mehrkernige Myotuben zu beobachten (in A' und B' in Kästchen eingerahmt). In A' und B' wurden zusätzlich die eingerahmten mehrkernigen Muskelzellen vergrößert dargestellt.

Die starken Störungen der analysierten Expressionsmutanten bestätigen die wichtige Rolle von Rac1 während der Myoblastenfusion. Im nächsten Schritt wurde die Präsenz von signifikanten Aktin-Plaques an den fusionierenden Kontaktmembranen untersucht.

6.3.2 Rac1 und Rac2 sind wichtige Aktin-regulatorische Komponente der Myoblastenfusion, dennoch werden in den stark zerstörten *racV12*, *racN17* und *rac1^{J11},rac2^Δ* Mutanten noch Aktin-Plaques gebildet

Der Prozess der Myoblastenfusion zur Bildung von multinukleären Muskelfasern zeichnet sich durch Akkumulation des F-Aktins an der Seite der kontaktierenden Membranen aus. Inwiefern die Aktin-regulatorische GTPase Rac an der Formierung, Aufrechterhaltung und Auflösung der Aktin-Plaques beteiligt ist, soll im Weiteren analysiert werden. Die vorhandenen *racV12* und *racN17* Mutanten weisen eine dramatische Störung in der Embryonalentwicklung, mit vermutlich völliger Blockierung der Myoblastenfusion, auf (Abb. 6.6). Inwiefern es hierbei zu einem kompletten Fusionsstopp kommt, muss noch näher analysiert werden. In *rac1^{J11},rac2^Δ* Doppelmutanten finden mehr Fusionsereignisse statt, was auf die Persistenz der maternalen Komponente zurückzuführen ist (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002). Zunächst soll aber geklärt werden, ob in diesen Mutanten Aktin-Plaques an der Seite der kontaktierenden Membranen gebildet werden. Mittels einer Phalloidin-Färbung zur Detektion des F-Aktins kann bestätigt werden, dass in allen drei Mutanten eine FCM-spezifische Aktin-Akkumulation in Form von Plaques vorhanden ist (Abb. 6.7, A-C). Eine weitere Erkenntnis, die aus dieser Färbung hervorgeht, ist die variable Größe bzw. Form der Aktin-Plaques. Während *rac1^{J11},rac2^Δ* Doppelmutanten eine mit dem Wildtyp vergleichbare Form der Plaques aufweisen (Abb. 6.7, C-D), erscheinen diese in der *racV12*-Expressionsmutante größer, was auf vermehrte Aktin-Polymerisation hindeuten könnte. Allerdings haben Haralalka *et al.* (2011) für den Rac1-Aktivator Mbc unter Verwendung von *mbc*-Mutanten gezeigt, dass in diesen die Plaques lediglich in ihrer Form diffuser sind, was auch für *racV12*-Embryonen zutreffen könnte, da die Aktin-Akkumulation nicht punktförmig konzentriert an der Kontaktstelle zu sehen ist, sondern über einen größeren Membranbereich verteilt ist (Abb. 6.7, A). Die Plaques der *racN17*-Mutante erscheinen dagegen verkleinert, was mit der reduzierten Aktin-Polymerisation einhergehen könnte (Abb. 6.7, B). Jedoch kann es bei dieser Momentaufnahme nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen früheren Zeitpunkt der Plaque-Formierung handelt, wo die endgültige Größe

6. ERGEBNISSE

noch nicht erreicht ist. Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass die ektopische Expression der aktiven bzw. inaktiven Form von Rac die Größe der Aktin-Plaques beeinflussen kann.

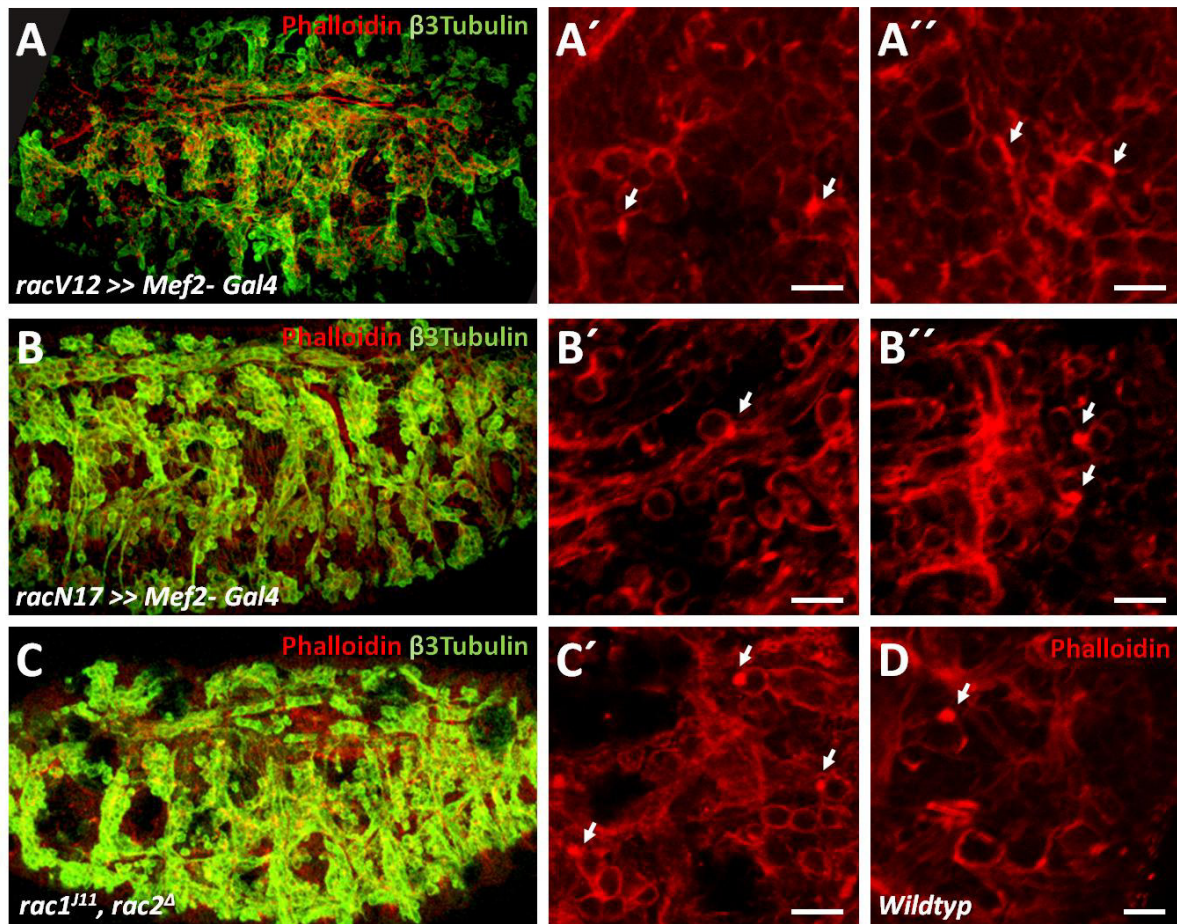


Abb. 6.7: Die Aktin-Plaques werden in *racV12*, *racN17* und *rac1^{J11}, rac2^Δ* Embryonen noch gebildet. A, B und C: Lateral dargestellte Embryonen, deren Muskulatur anhand von anti-β3-Tubulin angefärbt wurde (grün). Die Phalloidin-Färbung ist in rot sichtbar. A'-A'', B'-B'', C'-C'' und D: Vergrößerte Darstellung der F-Aktin-Strukturen, wodurch Aktin-Plaques auf der Seite der FCMs deutlich werden (Pfeile). Maßstabsbalken: 10 μm.

Das in Abschnitten 6.2.1 und 6.2.2 charakterisierte Profilin/Chic scheint sowohl an Wasp-, als auch an der Scar/Wave-vermittelten Aktin-Polymerisation beteiligt zu sein. Zudem ist es als Interaktionspartner für Rac1 während der Oogenese von *Drosophila* bekannt (Geisbrecht und Montell, 2004). Folgend soll untersucht werden, ob *rac1* und auch *rac2* mit *chic* im Hefe-2-Hybrid System interagieren.

6.3.3 Die Rho GTPasen *rac1* und *rac2* interagieren im Hefe-2-Hybrid System mit *chic*

Aufgrund der aktivierenden Wirkung der Rac GTPasen auf den Scar-Komplex sowie der anhand von Doppelmутanten postulierter genetischer Interaktion von *chic* und *scar*, wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, den Zusammenhang zwischen Chic und den Rac GTPasen

herzustellen. Zudem haben Geisbrecht und Montell (2004) gezeigt, dass die Expression von *Chic* die durch *Rac1N17* verursachten Migrationsdefekte der Border-Zellen während der Oogenese retten kann. Daher wurde zunächst versucht die induzierten Defekte der *rac1N17*-Mutante während der *Drosophila* Myoblastenfusion mittels UAS-*Chic* zu retten. Leider konnte die eigens dazu hergestellte transgene Linie *twi::chic::GFP* durch die Twist-spezifische Expression des *chic*-Gens die starken Fusionsstörungen der *rac1N17*-Mutante nicht retten (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist es von wissenschaftlichem Interesse, *Rac1* und *Rac2* in den dynamischen Vorgang der Bildung und Auflösung von Aktin-Plaques an der Kontaktstelle der fusionierenden Myoblasten zu integrieren. Die Verwendung des Hefe-2-Hybrid-Systems ermöglicht einen sensitiven Nachweis einer direkten Interaktion zwischen zwei Zielproteinen. Dazu wurde ein bereits vorhandenes *chic-pGBKT7*-Konstrukt verwendet (Doktorarbeit, V. Groth, 2011). Zudem wurde eine zielgerichtete Mutagenese an beiden Formen von *Rac* durchgeführt. Diese Methode ermöglicht einen spezifischen Aminosäureaustausch in der DNA-Sequenz mit dem Ziel eine konstitutiv aktive bzw. dominant negative Form des Proteins herzustellen. Für die aktivierte Form wurde die Aminosäure Glycin an der Position 12 gegen Valin ausgetauscht (G12V). Für die inaktive Form wurde an der Position 17 Threonin gegen Asparagin ausgetauscht (T17N). Die aktiven und inaktiven Formen der *rac1* und *rac2* Gene wurden erfolgreich in den komplementären Hefevektor, *pGADT7*, eingefügt. Der mit beiden DNA-Konstrukten ko-transformierte Hefestamm zeigt bei einer Protein-Interaktion, durch die Eigenschaft α -Galaktosidase zu verwerten, eine deutliche Blaufärbung. Dies ist der Fall bei der Positivkontrolle: das murine p53 interagiert mit dem T-Antigen (Li und Fields, 1993) (Abb. 6.8, 1). Die Negativkontrolle dagegen zeigt weder Wachstum der übergestrichenen Hefekolonien, noch eine Blaufärbung. Dies basiert auf dem humanen Lamin C (Lam) Protein, welches mit den meisten Proteinen nicht interagieren kann (Bartel *et al.*, 1993) (Abb. 6.8, 2). Die im Weiteren in Abb. 6.8 aufgeführten Tests zeigen in Vergleich zu der Positivkontrolle eine schwächere, dennoch deutliche Interaktion zwischen *chic* und allen Formen von *rac*.

6. ERGEBNISSE

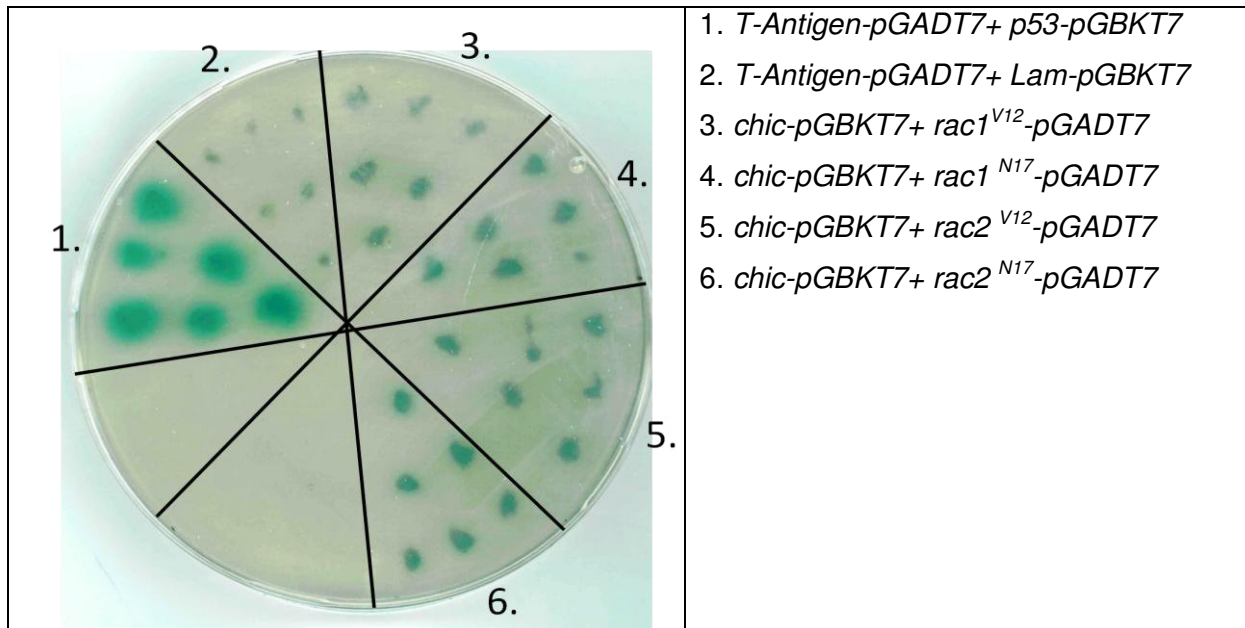


Abb. 6.8: **Direkte Interaktionstests für Rac1 und Rac2 unter Verwendung des Hefe-2-Hybrid-Systems.** Die blaue Färbung indiziert eine Interaktion der getesteten Proteine. In diesem Fall kommt es zu einer schwachen Interaktion zwischen Chic und allen verwendeten Rac- Formen (3-6) (Rac1V12, Rac2V12, Rac1N17 und Rac2N17). 1-2 stellen Positiv- und Negativkontrolle dar. Auf der rechten Seite sind die für den Test eingesetzten DNA-Konstrukte aufgeführt.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Chic sowohl mit Rac1, als auch mit Rac2 interagieren kann, und dass diese Interaktion nicht auf Aktivierung bzw. Inaktivierung von Rac beruht.

Da über die Aktivierung des pentameren Scar-Komplexes über die redundant wirkenden Rac GTPasen nur wenig bekannt ist, soll im nächsten Abschnitt auf die Rolle von Rac1 und im Besonderen von Rac2 während der Myoblastenfusion fokussiert werden. Dazu wird zunächst die Funktion von Rac2 mittels einer bereits vorhandenen Rac2-fl-GFP transgenen Fliegenlinie auf dessen Rettungseigenschaft der *rac1, rac2*-Doppelmutanten getestet. Im weiteren Ansatz werden mehrere Konstrukte hergestellt: die dominant-negative sowie die konstitutiv-aktive Form von Rac1 und Rac2. Diese werden für die im Weiteren beschriebene Hefe-2-Hybrid-Screens verwendet.

6.3.4 Die Mesoderm-spezifische Expression von Rac2-fl erzeugt eine komplette Rettung der Fusionsstörungen von *rac1, rac2*-Doppelmutanten und bereitet die Basis für die Herstellung von funktionellen Konstrukten für die Suche nach Interaktionspartnern im Hefe-2-Hybrid System

Kürzlich publizierte Daten von Haralalka *et al.* (2011) haben eine FCM-spezifische Rettung der *rac1, rac2*-Doppelmutanten mittels *sns-Gal4*-gesteuerter Expression der wildtypischen

6. ERGEBNISSE

Form von Rac1 gezeigt. Dabei konnten die Fusionsstörungen zu einem nahezu wildtypischen Muskelmuster gerettet werden. Aufgrund der redundanten Wirkung von Rac1 und Rac2, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, inwiefern eine Muskel-spezifische Expression von Rac2 in der Lage ist, die Fusion in den *rac1^{J11},rac2^Δ*-Doppelmutanten wiederherzustellen. Die dafür verwendete *Rac2-fl-GFP* transgene Fliegenlinie existierte im Labor bereits vor Beginn meiner Arbeit. Für das Rettungsexperiment wurde zunächst eine *rac1^{J11},rac2^Δ,UAS-Rac2-GFP*-Linie durch eine meiotische Rekombination hergestellt. Die Präsenz der *rac1^{J11},rac2^Δ*-Mutationen wurde anhand des embryonalen Phänotyps überprüft, während das UAS-Rac2-GFP-Konstrukt mittels PCR-Nachweis bestätigt wurde. Durch das Verkreuzen der hergestellten Linie mit *twist-Gal4; rac1^{J11}, rac2^Δ, mtl^Δ*- Fliegen wird eine Mesoderm-spezifische Expression von UAS-Rac2 im *rac1^{J11},rac2^Δ* mutanten Hintergrund erzeugt. Abb. 6.9 stellt eine komplette Rettung der Fusionsstörungen der Doppelmutanten dar. Diese Ergebnisse demonstrieren die Funktionalität des UAS-Rac2-GFP Konstrukts und verifizieren die funktionelle Redundanz der beiden Rho GTPasen. Zudem bereitet dieses Experiment die Basis für die Herstellung weiterer dominant-negativer sowie konstitutiv-aktiver *rac*-Konstrukte für einen Hefe-2-Hybrid-Screen.

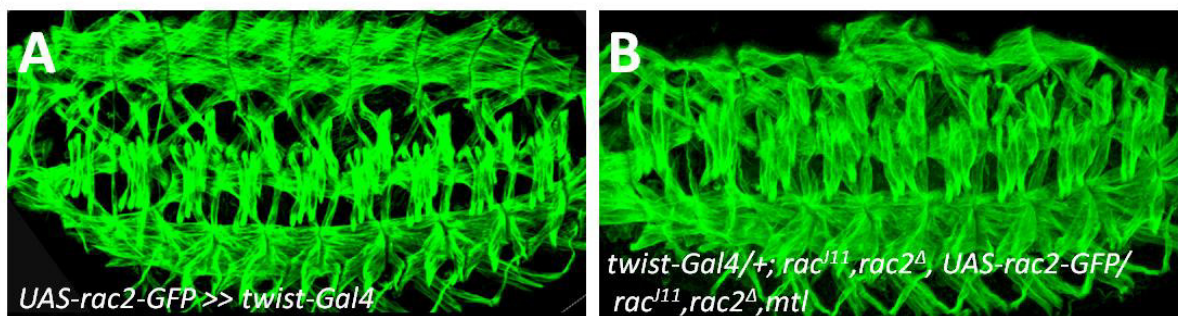


Abb. 6.9: **Die Mesoderm-spezifische Expression von Rac2 rettet den *rac*-Doppelmutantenphänotyp.** A: Die Mesoderm-spezifische Expression von Rac2 mittels eines *twist*-Treibers zeigt ein wildtypisches Muskelmuster. B: Die gleiche Expression in dem *rac*-Doppelmutanten-Hintergrund führt zu einer signifikanten Abschwächung des Fusionsphänotyps und stellt das wildtypische Muskelmuster wieder her.

Obwohl die Schlüsselfunktion von Rac1 bei zahlreichen Signalwegen bekannt ist, bleibt die Rolle von Rac2 weitgehend unerforscht. So wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht neben Rac1 die Notwendigkeit von Rac2 während der Myoblastenfusion aufzudecken. In einer kürzlich publizierten Studie wurde Mbc als ein FCM-spezifischer Rac1-Aktivator identifiziert (Haralalka *et al.*, 2011). Da jedoch das durch Rac1 aktivierte Scar/Wave-Protein in beiden Myoblastentypen benötigt wird (Sens *et al.*, 2010), ist es von besonderem Interesse zusätzliche Aktivatoren bzw. Inaktivatoren für Rac1 und Rac2 aufzudecken, die in FCMs und/oder FCs wirken. Bezüglich der Myoblastenfusion existieren bisher noch keine Kandidaten. Demzufolge wurden dominant-negative sowie konstitutiv-aktive Formen von

6. ERGEBNISSE

Rac1 und Rac2 durch einen Aminosäureaustausch hergestellt und in den pGBKT7-Hefvektor eingebracht. Diese generierten Konstrukte wurden für den im Folgenden beschriebenen Hefe-2-Hybrid Screen verwendet um nach putativen Interaktionspartnern in einer cDNA-Bibliothek zu suchen. Vor dem Screen sollten die hergestellten Konstrukte jedoch auf deren Funktionalität getestet werden. Dazu wurden die mutagenisierten *rac1* und *rac2* in die modifizierte Gateway-Vektoren mit dem vorhandenen C-terminalen eGFP-, mCherry- oder 10-fachem Myc-Tag eingebracht und in die Embryonen des geeigneten Fliegenstamms injiziert. Durch das Vorhandensein der UAS (Upstream Activation Sequence) kann das GAL4-System genutzt werden (Brand und Perrimon, 1993), um das mutierte, mit einem Tag versehene Konstrukt, Gewebe-spezifisch zu exprimieren. Hierbei konnte zunächst bei einer Mesoderm-spezifischen Expression weder bei Rac1, noch bei Rac2 ein Fusionsphänotyp beobachtet werden (Luo *et al.*, 1994). Da es sich bei den Rac-GTPasen um sehr kleine Proteine handelt, könnten sich die eingefügten Tags für deren Funktionalität als störend erweisen. Deswegen wurde zur Kontrolle zusätzlich *rac1V12* in den modifizierten Gateway-Vektor ohne Tag kloniert. Die Expression dieses Konstrukts im *Drosophila* Mesoderm führte zu einem variablen Phänotyp; während der starke Fusionsstörungen aufweisende *rac1V12*-Phänotyp aus Luo *et al.* (1994) nicht beobachtet werden konnte, zeigen die Embryonen eine abgeschwächte Version des beschriebenen Phänotyps (Abb. 6.10). Dennoch weist der vorhandene Fusionsphänotyp auf die Funktionalität des getesteten Konstrukts hin und kann für den Hefe-2-Hybrid Screen verwendet werden. Bezüglich des *rac2V12*- Konstrukts wurden keine transgene Fliegenlinien generiert.

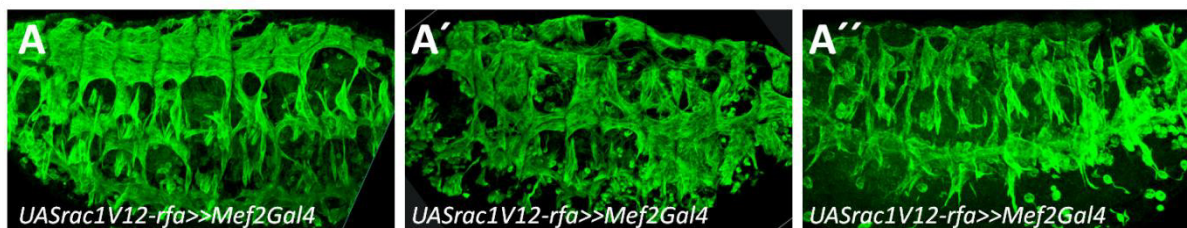


Abb. 6.10: **Mesoderm-spezifische Expression der eigenen hergestellten *rac1V12* transgenen Fliegenlinie deutet auf einen variablen Phänotyp hin (A-A'').** Die in 16-ten Entwicklungsstadium dargestellte Embryonen wurden einer $\beta 3$ -Tubulin-Färbung zum Sichtbarmachen der Muskulatur unterzogen. Trotz der zahlreichen unfusionierten Myoblasten können auch reife Myotuben beobachtet werden.

6.3.5 Die Durchführung eines Hefe-2-Hybrid-Screens mit der aktivierten Form von Rac1 und Rac2 deckt neu potentielle Interaktionspartner der GTPasen auf

Es ist bekannt, dass die GTPase Rac in Aktin-basierte Prozesse involviert ist. Während der Entwicklung des *Drosophila* Embryos ist es vor allem bei dem Wachstum und Weiterleitung der Axone, bei der dorsalen Schließung der Epidermis und bei der Myoblastenfusion beteiligt

(Harden *et al.*, 1995; Luo *et al.*, 1994). Um Rac1 in die bekannten Signalkaskaden zu integrieren, wurden Interaktionsstudien durchgeführt und das Zusammenwirken mit einigen Aktin-regulatorischen Proteinen, wie beispielsweise mit Mbc, mit dem pentameren Scar-Komplex oder mit der Pak-Kinase, nachgewiesen (Haralalka *et al.*, 2011; Lebensohn und Kirschner, 2009; Duan *et al.*, 2012). Da Mbc nur in FCMs für die Aktivierung von Rac1 verantwortlich ist gilt zu klären, ob es auch bei den Rac GTPasen eine Zellspezifität vorhanden ist und inwiefern es Unterschiede in der Regulation von Rac1 bzw. Rac2 in FCs und/oder FCMs gibt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein Hefe-2-Hybrid Screen mit den aktivierten Formen von Rac1 und Rac2 durchgeführt. Da die Funktion von Rac2 weitgehend unerforscht ist, war es wichtig den Screen für beide Rac GTPasen durchzuführen, um anhand von identifizierten Interaktionspartnern auf die Funktionen der Proteine zu schließen und mögliche Parallelen aufzudecken. Dazu wurden *rac1V12* und *rac2V12* in den pGBKT7-Hefektor an die DNA-Bindedomäne fusioniert. Dieses Hybridprotein, auch als Köderprotein bezeichnet, wurde nun gegen eine im Labor generierte cDNA-Bank gescreent. Werden die Hefezellen mit beiden Vektoren ko-transformiert, so kommt es im Zellkern zur Expression der Hybridproteine. Die Reporter-gen-Aktivität kann zum Einen durch das Wachstum auf hochstringenten SD-Platten ohne Adenin, zum Anderen durch einen Test auf X- α -Galaktosidase-Aktivität geprüft werden. Nach der Plasmid-DNA-Isolation aus den positiven Hefeklonen, erfolgt die Sequenzierung und die Analyse der als Interaktionspartner identifizierten Gene. In der Tabelle 6.1 sind alle sequenzierten Klone für *Rac1V12* aufgeführt. Dabei wurden einige Klone anhand ihres Wirkungsorts ausgeschlossen; diese sind grau hinterlegt. Um abzuklären, inwiefern die Interaktion der identifizierten Partner auf der Aktivierung von Rac1 beruht, wurden diese Kandidaten auf eine direkte Interaktion mit dem dominant negativen Rac1N17 untersucht. Dabei konnte bei allen Klonen eine Interaktion nachgewiesen werden, sodass festgestellt werden kann, dass diese nicht auf die Aktivität von Rac1 zurückzuführen ist. Des Weiteren wurden diese Interaktionspartner anhand des Phänotyps der vorhandenen Mutanten oder mittels *in situ* Hybridisierung analysiert und werden im Folgenden beschrieben.

6. ERGEBNISSE

Tabelle 6.1: **Tabellarische Zusammenstellung der aus dem Hefe-2-Hybrid-Screen identifizierten Interaktionspartner für Rac1V12.** Die grau hinterlegten Klone wurden bei der Auswertung vernachlässigt.

	Klon Nr.	CG-Nr.	Synonym/ Bezeichnung	Beschriebene Funktion	Phänotypisch analysierte Fliegenlinien	Mittels <i>in situ</i> analysierte cDNAs
1	1	16979	-----	-Thiolester- Hydrolase	BL18103 BL24946 kein Muskel-Phänotyp	
2	4			-Mitochondriales Genom	-----	
3	3+5	4027	Act5C	-Spermien Individualisierung -Phagozytose -Protein: Aktin-/Aktin-ähnliche konservierte Bereiche	BL9258 BL24778 - kein Muskel-Phänotyp, Lokalisation an der Kontaktstelle der Myoblasten	
4	6	42317	Csk/C-term. Src Kinase	-Tyrosin- Kinase - Peptidyl-Tyrosine Phosphorylierung, negative Wachstumsregulation, Aufrechterhaltung von Adherens Junctions -Protein: SH2- und katalytische Domänen, ATP-Bindung	BL10244 BL35174 kein Muskel-Phänotyp	LP09923 -Mesoderm-spezifische Expression bis ca. Stadium 13
5	9	14206	RpS10b	-Ribosomales Protein	-----	
6	2			-Mitochondriales Genom	-----	
7	16	7178	WupA/ Troponin I (Tnl)	-Aktin und Tropomyosin Bindung -Myofibrillen Assemblierung -Entwicklung der Skelettmuskulatur, der Herzmuskeln und des Nervensystems, Sarkomer- Organisation	BL31893 <i>UAS-wupRA</i> ^{L9} wurde von A.Ferrus zur Verfügung gestellt (Sahota <i>et al.</i> , 2009) -kein Muskel-Phänotyp	GM04081 - in Stadien 13-14 Mesoderm-spezifische Expression
8	14	8560	-----	-Zinkion-Bindung -Metalloprotease - schwache embryonale Expression im Darm	-----	
9	12			-Mitochondriales Genom	-----	

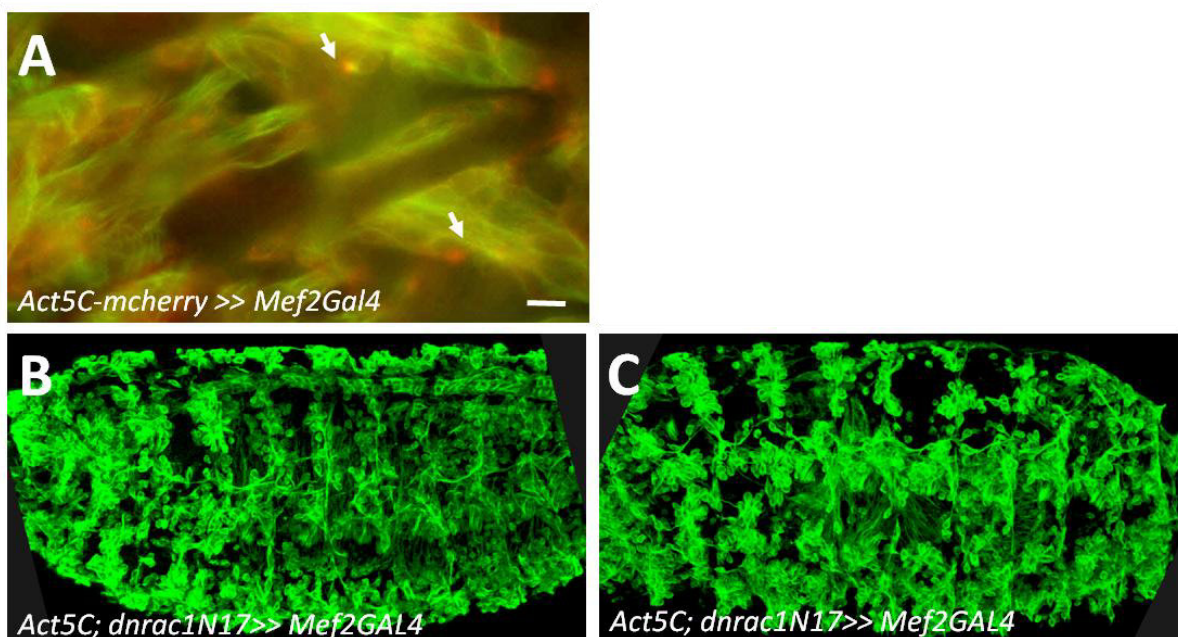
6. ERGEBNISSE

10	11			-Mitochondriales Genom	-----	
11	15	12172	Spn43a (Serp43Aa)	-Serin-Typ Endopeptidase-Inhibitor -Protein: Serpin-Domäne - embryonale Expression im Tracheensystem	-----	
12	17	5920	RpS2	-Ribosomales Protein	-----	
13	22	14643	TweedleG	- Bestandteil von Chitin-Kutikula	-----	RE68367 -keine Mesoderm-spezifische Lokalisation, im Stadium 16 ektodermal lokalisiert
14	25			-Mitochondriales Genom	-----	
15	26	5670	Atpα	-α-Untereinheit der Natrium-Pumpe -ATPase-Aktivität -Kation -Transmembran- Transporter	-----	
16	27		Fax (Failed axon connection)	-Axonogenese -Neurogenese	BL8786 BL33687 -kein Muskel-Phänotyp	
17	23	16982	Roc1a	-Ubiquitin-Protein-Ligase -Protein: Zink-Finger Domäne, Ring-H2-Typ-Domäne	BL34047 BI34050 BL32362 -kein Muskel-Phänotyp	SD23839 -schwache mesodermale Lokalisation bis Stadium 13 anzunehmen
18	40			-Mitochondriales Genom	-----	
19	42	8669	Crc (cryptocephal)	-Regulation der Transkription der RNA-Polymerase II -Metamorphose, Verpuppung -Protein: bZIP- Domäne -im Stadium 14 schwache embryonale Expression in Darm	-----	
20	43	2163	Pabp2	-RNA-Bindung -mRNA-Polyadenylierung, Neurogenese -Protein: Nukleotid-Bindung, RNA-Erkennungsdomäne	-----	

6.3.5.A Mutantenanalyse und Ermittlung der mRNA Transkription der potentiellen Interaktionspartner für Rac1V12

Das Gen *CG16979* kodiert für eine Thioesterase, dessen Funktion die katalytische Spaltung von Thioesterbindungen ist. Da sowohl eine Defizienzlinie *Df(3L)BSC442*, als auch eine letalen P-Element-Insertionsmutante *CG16979^{EY23266}* keine Veränderung der embryonale Muskulatur verursacht, ist davon auszugehen, dass das Gen keine Rolle bei der Myoblastenfusion zu haben scheint.

Eine strukturelle Komponente des Aktin-Zytoskeletts ist das zytoplasmatische Protein *Actin5C*. Dieses ubiquitär exprimierte Gen ist in zahlreiche zelluläre, morphologische und entwicklungsgenetische Vorgänge involviert. Die Aktin-regulatorische Funktion von Rac wurde während der Migration der Border-Zellen nachgewiesen. Weiterhin konnten in diesem Gewebe die, durch die Expression der dominant-negativen Form der GTPase Rac bedingten Migrationsdefekte, durch die Expression von *Act5C* gerettet werden (Geisbrecht und Montell, 2004). Zur Analyse der Act5C-Lokalisation wurden UAS-Konstrukte verwendet, die mit einem Fluoreszenz-Tag versehen waren. Nach der Mesoderm-spezifischen Expression, konnte eine spezifische Proteinlokalisierung an der Kontaktstelle der Myoblasten beobachtet werden, was eine Kolo-kalisation mit den Aktin-Plaques vermuten lässt (Abb.6.11, A). Zusätzlich, angelehnt an Geisbrecht und Montell (2004), wurde ein Rettungsexperiment der durch die Expression von *Rac1N17* hervorgerufenen Fusionsdefekte durchgeführt. Hierbei zeigte eine Mesoderm-spezifische induzierte Expression von Act5C keine Rettung der bestehenden Fusionsdefekte (Abb. 2.5, C; Abb. 6.11, B-C).



6. ERGEBNISSE

Abb. 6.11: **Act5C lokalisiert an der Kontaktstelle der fusionierenden Myoblasten ist aber nicht in der Lage den *rac1N17* Phänotyp zu retten.** (A) Mesoderm-spezifische Expression von UAS-Act5C-mCherry, zeigt anhand des mCherry-Signals (rot) die Lokalisation des Konstrukts an der Zellkontaktstelle (Pfeile). Die embryonale Muskulatur ist in grün dargestellt. Maßstabbalken: 5 μ m. (B-C) Die gleichzeitige Expression von UAS-Act5C und UAS-RacN17 führt zu keiner Rettung des *rac1N17* Phänotyps; die embryonale Muskulatur zeigt starke Fusionsstörungen.

Die Tyrosinkinase Src reguliert zahlreiche zelluläre Prozesse, zu welchen hauptsächlich Zellproliferation und Onkogenese gehören. Die Kinaseaktivität wird durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung eines Tyrosinrests gesteuert, sodass es zu einer Interaktion mit SH2-SH3-Domänen tragenden Proteinen kommen kann. Vor allem durch die Anbindung der SH3-Domäne wird die Kinasefunktion gehemmt, wodurch die Src-Kinase in einem inaktiven Zustand vorliegt. Die in dem Screen identifizierte C-terminale Src-Kinase (Csk) fungiert als ein wichtiger negativer Regulator der Src-Familie-Proteine. Diese phosphoryliert die Src-Kinase und bedingt deren Inaktivierung. Humane Zellkulturmodelle haben zusätzlich zahlreiche nachgeschaltete Effektorgene der Src-Kinase identifiziert; zu diesen gehören neben den Signalmolekülen des Jak/STAT Wegs, auch die, in die Rac/Rho-GTPasen- gesteuerte Signalwege, involvierte Moleküle (Thomas *et al.*, 1997). Da *Drosophila* ein gut zugänglicher Modellorganismus ist, konnte unter Verwendung von Imaginalscheiben die Funktion von Csk als Tumor-Suppressor nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Nullmutanten, eine deutliche Größenzunahme des untersuchten Organs sowie ein Übermaß an zellulärer Proliferation (Read *et al.*, 2004). Aufgrund der möglichen vorgeschalteten Wirkung der Csk-Src-Interaktion auf den Rac-abhängigen Signalweg, wurde dieser potentielle Interaktionspartner zunächst auf mRNA-Ebene analysiert. Die *in situ* Hybridisierung zeigt, dass die mRNA im Embryo erst ab dem Stadium des zellulären Blastoderms transkribiert und nicht maternal bereitgestellt wird (Abb. 6.12, A-B). Weiterhin ist in frühen embryonalen Stadien eine ubiquitäre Verteilung zu beobachten, wobei eine spezifische mesodermale Lokalisation bis zum Stadium 13 anzunehmen ist (Abb. 6.12, C-E, Pfeile). Eine zusätzliche phänotypische Untersuchung einer letalen mutierten Linie zeigte keine Veränderung des wildtypischen Muskelmusters, was einerseits die Relevanz dieses Gens bei der Myoblastenfusion in Frage stellt, andererseits auf mögliche Redundanzen hindeutet.

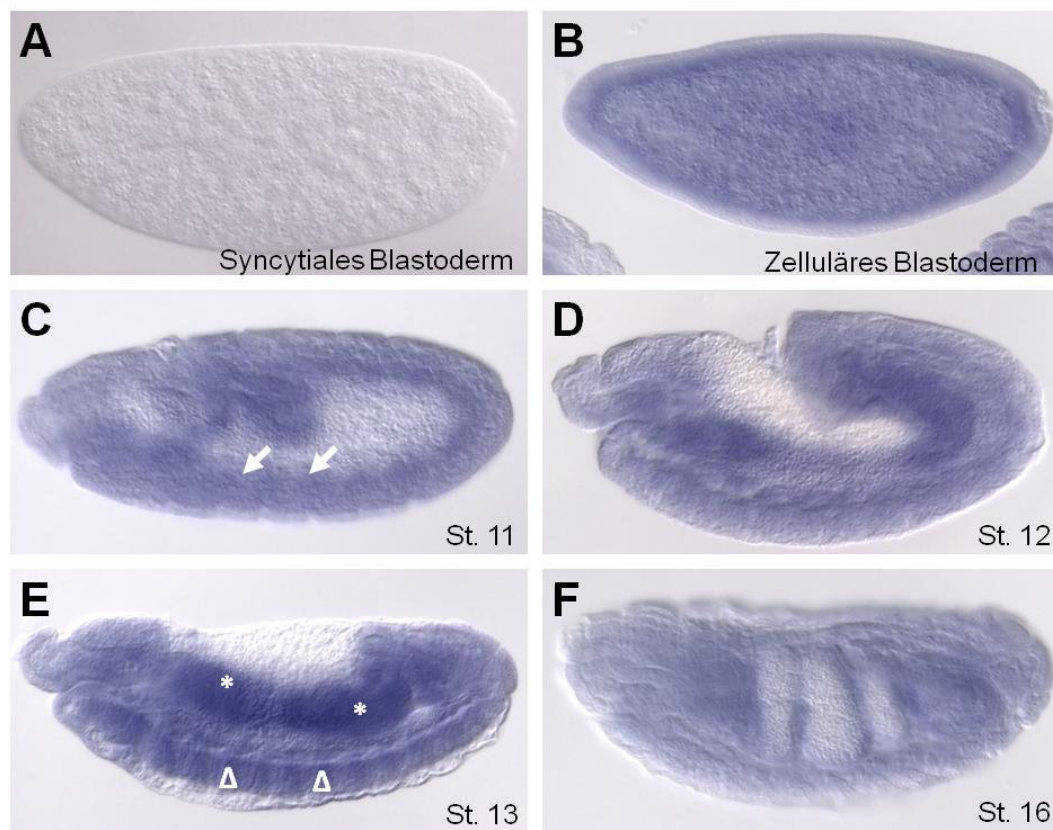


Abb. 6.12: *In situ* Hybridisierung an wildtypischen *Drosophila* Embryonen mittels *csk*-spezifischen Sonde lässt eine Transkription in Mesoderm der frühen Stadien vermuten. *Csk*-mRNA wird nicht maternal transkribiert und ist erst ab dem Stadium des zellulären Blastoderms detektierbar (A-B). In weiteren frühen Stadien ist das Mesoderm mit Pfeilen angedeutet (C). Im Stadium 13 transkribieren der aufeinander zuwandernde Mitteldarm (E, Sterne) und das zentrale Nervensystem (E, Pfeilköpfe) ebenfalls das Transkript. Im späteren Stadium 16 ist kein deutliches Signal mehr sichtbar (F).

TroponinI (TnI), auch bekannt als Wings up A (WupA), ist ein Aktin-bindendes Protein, das zusammen mit Tropomyosin die Sarkomer-Kontraktion in den Skelett- und Herzmuskeln reguliert. Der Komplex aus beiden Proteinen reagiert auf Ca^{2+} -abhängige Konformationsänderung und kontrolliert die Aktin-Myosin Interaktion. TnI besitzt drei Untereinheiten: C, T und I, wobei die Untereinheit C für die Kalzium-Bindung und die Untereinheit T für die Tropomyosin-Bindung verantwortlich ist (Clark *et al.*, 2002). In *Drosophila* führt eine Mutation in *wupA*-Gen zu einer Hyperkontraktion und Degeneration der indirekten Flugmuskulatur (Prado *et al.*, 1995). Während der frühen Embryogenese weisen die Funktionsverlust-Mutanten anormale Kernteilung mit dem regelmäßigen Verlust der Chromosomfragmente, was auf eine wichtige Funktion von TnI bei der Regulation der Kernteilung hindeutet (Sahota *et al.*, 2009). In der genannten Studie konnte auch gezeigt werden, dass TnI eine maternale Komponente aufweist, was nicht mittels *in situ*-Hybridisierung, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, verifiziert werden konnte. Unter Verwendung der *TnI*-spezifischen Sonde konnte festgestellt werden, dass die Präsenz

6. ERGEBNISSE

der *TnI*-mRNA erst ab den Stadien 13 bis 14 detektierbar ist (Abb. 6.13, A-C). Das Transkript scheint spezifisch in der embryonalen somatischen Muskulatur zu lokalisieren (Abb. 6.13, C-D, Pfeile).

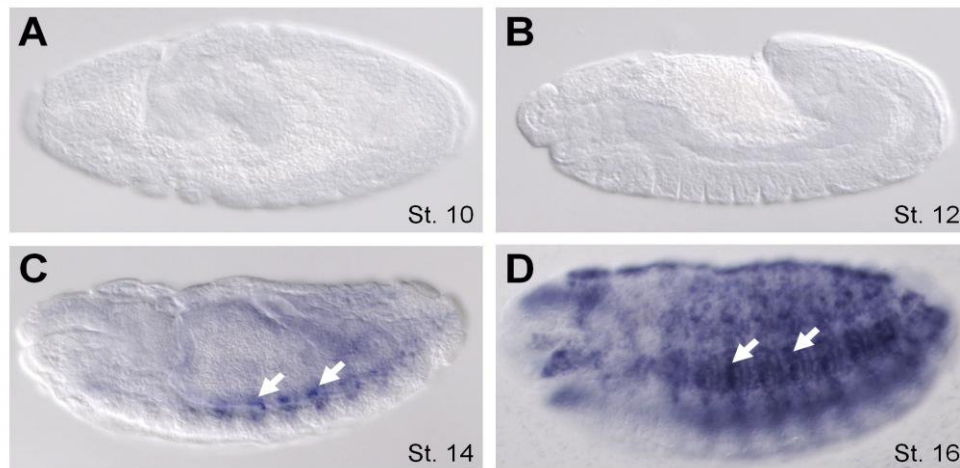


Abb. 6.13: *In situ*-Hybridisierung mit der *TnI*-spezifischen Sonde zeigt eine Transkription in späten Mesoderm. In den frühen Stadien der wildtypischen Embryonen ist kein *TnI*-Transkript nachzuweisen (A-B). Erst ab dem Stadium 13 bis 14 ist eine Mesoderm-spezifische Lokalisation nachweisbar (C, Pfeile). In den späteren Stadien (16) ist die somatische embryonale Muskulatur deutlich detektierbar (D, Pfeile).

Um die Proteinlokalisierung im *Drosophila* Embryo zu bestimmen, wurde ein Antikörper, welcher gegen die Peptidsequenz der embryonal-spezifischen *TnI* Isoformen gerichtet ist (anti-*TnI* J4), von Dr. Alberto Ferrus zur Verfügung gestellt. Auch die *UAS-wupRA*^{L9}-Linie wurde von derselben Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (Sahota *et al.*, 2009). Bei einer ektopischen Expression dieses Konstrukts mit *wingless-Gal4* zur Kontrolle des Antikörpers wurde kein *wingless*-typisches Streifenmuster detektiert. Daher ist anzunehmen, dass der Antikörper in Embryonen nicht funktional ist.

Ein struktureller Bestandteil der Chitin-basierten Arthropoden Kutikula ist das Protein TweedleG. Dieses gehört zu der unkonventionellen Kutikula-Proteinfamilie. Obwohl es für die Myogenese nicht relevant zu sein scheint, so ist die Interaktion mit Rac1 dennoch nicht unwahrscheinlich, denn die GTPase ist in zahlreiche zellregulatorische Prozesse involviert. Zudem konnte in einem Hefe-2-Hybrid-Screen für Kette, einen Bestandteil des pentameren Scar-Komplexes, der die Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisation steuert, ein weiterer Mitglied der unkonventionellen Kutikula-Proteinfamilie identifiziert: TweedleD (Sven Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, unveröffentlichte Daten). Aus diesem Grund wurde *in situ* Hybridisierung mit der *tweedleG*-spezifischen Sonde an wildtypischen *Drosophila* Embryonen durchgeführt. Dabei konnte zum Einen im syncytialen Blastoderm eine maternale Bereitstellung von *tweedleG*-mRNA festgestellt werden (Abb. 6.14, A), zum

6. ERGEBNISSE

Anderen zeigte eine ubiquitäre Lokalisation in weiteren Entwicklungsstadien, dass die mesodermale Transkription nicht ausgeschlossen werden kann (Abb. 6.14, B-C). In Stadium 16 ist eine epidermale Lokalisation erkennbar, was mit der Grundfunktion des TweedleG Proteins bei der Kutikulabildung korreliert, denn diese Schutzschicht entsteht als ein mehrlagiges Sekretionsprodukt der Epidermiszellen (Abb. 6.14, D).

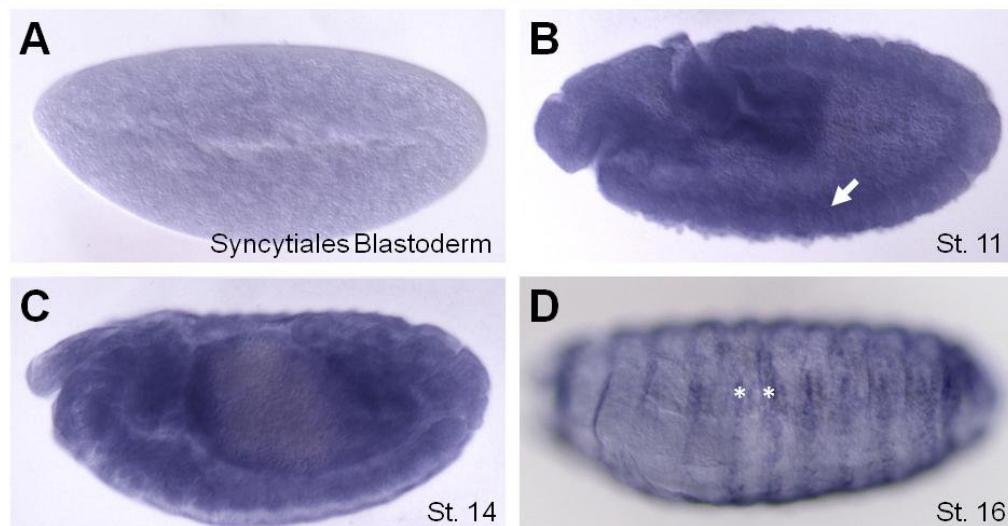


Abb. 6.14: ***In situ*-Hybridisierung an *Drosophila* Wildtyp-Embryonen weist eine Transkription in der Epidermis.** Anhand der Färbung im syncytialen Blastoderm ist erkennbar, dass *tweedleG*-mRNA maternal bereitgestellt wird (A). Weitere dargestellte Entwicklungsstadien zeigen eine ubiquitäre Transkription, wobei im Stadium 11 das Mesoderm mit einem Pfeil angedeutet ist (B-C). Im Stadium 16 ist eine Lokalisation in der embryonale Epidermis zu verzeichnen (D,*).

Das Gen *failed axon connection (fax)* wurde erstmals in einem genetischen Screen als Interaktionspartner für die Abelson Tyrosinkinase (Abl) identifiziert (Gertler *et al.*, 1989, Hill *et al.*, 1995). *Drosophila* Abl reguliert das Auswachen der Axone und die neuronale Wegfindung durch die Mitwirkung in der vorgeschalteten Signaltransduktionskaskade. Weiterhin konnte eine dosis-sensitive Interaktion zwischen *abl*, *fax*, *ena/Vasp* und dem RacGEF *trio* nachgewiesen werden, wodurch eine Verbindung zwischen Fax und Rac in diesem Gewebe gegeben ist (Liebl *et al.*, 2000). Trio reguliert die Funktion von Rac1 im ZNS, scheint aber für die Myoblastenfusion unbedeutend zu sein. Die Funktion von Abl bei der Myogenese von *Drosophila* ist noch weitgehend unerforscht. Die *in situ* Hybridisierung für *fax* an Embryonen zeigt in früheren Stadien das Transkript im viszeralem Mesoderm; in späteren Stadien ist das Signal auf das zentrale und peripheren Nervensystem beschränkt (Hill *et al.*, 1995). Um zu analysieren, ob *fax* eine Rolle bei der Myoblastenfusion spielt, wurde eine, durch die Behandlung mit Ethylmethasulfonat (EMS) erzeugte, Mutante auf Defekte in der Körperwandmuskulatur untersucht. Die phänotypische Analyse zeigte keine Störungen der

6. ERGEBNISSE

Muskulatur, was auf eine nicht-funktionelle Rolle des Fax-Proteins während der Myogenese von *Drosophila* oder eine mögliche Redundanzwirkung hindeutet.

Das *Drosophila* Roc1a ist eine Komponente des Multi-Protein-Komplexes E3 Ubiquitinligase, welcher die Ubiquitinierung der Proteine, die für die proteasomale Degradation bestimmt sind, katalysiert. Interessant ist der durchgeführte RNAi Screen für zahlreiche Aktin-bindende und Aktin-regulatorische Komponente (Rohn *et al.*, 2011). Dabei konnte bei der Gen-Stilllegung unter Verwendung der *Drosophila* SR2⁺- Zellen, der gleiche Phänotyp sowohl für Roc1a, als auch für die Komponente des Rac-Scar/Wave-Signalwegs beobachtet werden. Die Zellen wiesen in diesen Fällen Membranfortsätze, sogenannte Spikes, auf der Oberfläche auf. Um die Rolle von Roc1a in der *Drosophila* Myogenese zu studieren, wurde zunächst eine *in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Abb. 6.15 zeigt eine ubiquitäre Verteilung der *roc1a*-mRNA in den embryonalen Entwicklungsstadien. In den Stadien 10-13 ist eine schwache mesodermale Transkription zu vermuten (Abb. 6.15, B-D, Pfeile). Im Stadium 16 ist das Transkript nur schwach in Darm lokalisiert (Abb. 6.15, E, Sterne).

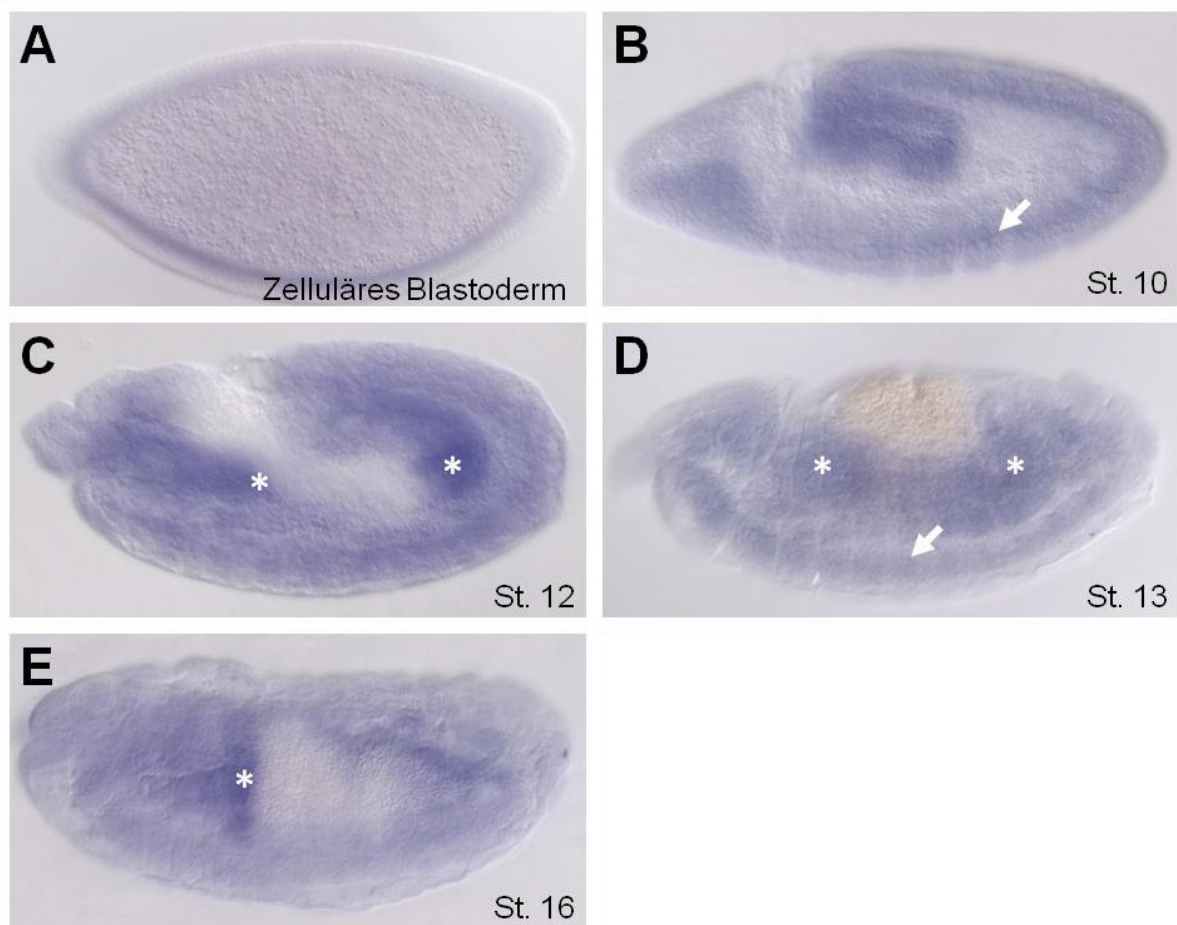


Abb. 6.15: *In situ*-Hybridisierung an wildtypischen *Drosophila* Embryonen unter Verwendung einer *roc1a* spezifischen-Sonde zeigt keine deutlich Spezifität der Transkriptlokalisation. Das zelluläre Blastoderm zeigt

6. ERGEBNISSE

eine schwache ubiquitäre Färbung (A). Die mRNA ist in den frühen Stadien schwach im Mesoderm detektierbar (B-D, Pfeile). Auch die Lokalisation im viszeralem Mesoderm ist ab dem Stadium 12 erkennbar (C-E, Sterne).

Zusätzlich wurde eine für *roc1a* defiziente Linie einer phänotypischen Analyse unterzogen. Hierbei konnte keine Veränderung des Muskelmusters beobachtet werden. Anhand der hier durchgeführten Experimente kann eine Beteiligung von Roc1a an der Muskelbildung nicht eindeutig bestätigt bzw. ausgeschlossen werden.

6.3.5.B Die mittels Hefe-2-Hybrid Screens identifizierte Interaktionspartner für Rac2V12

Da auch Rac2 während der Myoblastenfusion eine bedeutende Rolle zugewiesen wird, wurde in einem weiteren Hefe-2-Hybrid Screen unter Verwendung von Rac2V12 als Köderprotein nach Interaktionspartner gesucht. Tabelle 6.2 stellt zusammenfassend die Ergebnisse des Screens dar. Dabei wurden mögliche, beschriebene Funktionen dieser potentiellen Interaktionspartner ermittelt. Die in der Tabelle grau hinterlegten Proteine werden, aufgrund ihres Wirkungsorts, von weiteren Analysen ausgeschlossen. Die interessanten Kandidaten wurden zusätzlich auf eine direkte Interaktion mit dem dominant negativ wirkenden Rac2N17 getestet. Hierbei konnte mit allen, abgesehen von Brahma associated protein (Bap) 55, eine direkte Interaktion nachgewiesen werden. Aus zeitlichen Gründen steht die Auswertung dieser Klone noch aus. Aufgrund der funktionellen Redundanz von Rac1 und Rac2 wurde vermutet, dass die beiden durchgeführten Screens gleiche Interaktionsproteine identifizieren. Dies war jedoch nicht der Fall. Bezüglich der in dem für Rac2V12 Screen identifizierten Interaktionspartner ist anzunehmen, dass die Proteine Bap55 und Myospheroid (Mys), aufgrund der beschriebenen Funktion, die interessantesten Kandidaten sind (Tab.6.2). Diese werden im Folgenden dargestellt.

Für den Chromatin-Umstrukturierungsfaktor Bap55 wurde kürzlich eine essentielle Beteiligung an der olfaktorischen Neuronprojektion von *Drosophila* beschrieben (Tea und Luo, 2011). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass es sich bei Bap55 um ein Arp handelt, das als eine Komponente des sogenannten BAP-Komplexes während der Chromatin-Umstrukturierung fungiert. Weiterhin konnte durch eine Immunoprecipitation eine Komplexbildung mit Brahma-chromatin-remodelling (BRM) nachgewiesen werden, was auf eine Zellkern-spezifische Lokalisation des Proteins hindeutet (Papoulas *et al.*, 1998). Anhand seiner Aktin-ähnlichen Struktur stellt Bap55 einen potentiellen Interaktionspartner für Rac2 dar.

Das *Drosophila* β -Integrin Mys ist eine Integrin-Komponente eines Adhäsionsrezeptors, der aus einer heterodimerischen Bindung von α - und β -Untereinheiten, hervorgeht. In Vertebratenzellen ist es bekannt, dass eine Bindung von Integrinen an die extrazelluläre

Matrix die Aktivierung der Rac GTPase nach sich zieht (DeMali *et al.*, 2003). Für *Drosophila* konnte ebenfalls kürzlich gezeigt werden, dass sowohl Rac1, als auch Rac2 stromabwärts von Mys agieren und essentiell für die zelluläre Antwort auf den parasitären Wespenbefall der Larven sind (Xavier und Williams, 2011). Somit stellt Mys einen weiteren potentiellen Interaktionspartner für Rac2 dar. Eine Beteiligung an der Myoblastenfusion ist jedoch auszuschließen, da β -Integrin in *Drosophila* nur für die Anheftung der Muskeln benötigt wird.

6. ERGEBNISSE

Tabelle 6.2: **Tabellarische Zusammenstellung der potentiellen Interaktionspartner für Rac2V12, die mittels eines Hefe-2-Hybrid-Screens identifiziert worden sind.** Die grau hinterlegten Proteine können bei der Auswertung vernachlässigt werden.

	Klon Nr.	CG-Nr.	Synonym/ Bezeichnung	Beschriebene Funktion	Bestellte Fliegenlinien
1	34	6567	-----	-Lysophospholipase -Spaltung von Phospholipiden	BL19313
2	35+60+ 32	-----	-----	Ribosomales Protein S1b	
3	41	1836	Rad23	-DNA-Bindung und DNA-Reparatur, -Protein: N-terminale Ubiquitin-ähnliche Domäne - potentielle Involvierung in Ubiquitin-vermittelte Protein Degradation - <i>in situ</i> - Hybridisierung: starke maternale Komponente (BDGP Daten)	
4	55	32473		-Aminopeptidase -Katalyse von Abspaltung N-terminale Aminosäuren - starke maternale Komponente (BDGP Daten)	
5	1			Mitochondrial large ribosomal RNA (mtlrRNA)	
6	10	7748	OstStt3 (Oligosaccharyltransferase 3)	-Glykosyltransferase -Biosynthese der Oligosaccharide -lokalisiert in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) - <i>in situ</i> - Hybridisierung: starke maternale Komponente, später im Hinterdarm (BDGP Daten)	BL10340
7	9			Mitochondriales Genom	
8	108	5840		-Pyroline-5-carboxylate reductase, -Katalyse der Reduktion von Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate (P5C) zu NAD(P)H - wichtig für das intrazelluläre Redoxpotential und Apoptose - kein embryonale Transkription (BDGP Daten)	
9	101	3874	Frc (Fringe connection)	-Nukleotid-Zucker-Transmembran-Transporter -transferiert UDP-Galaktose aus der Zytoplasma in den Lumen des ERs und/oder des Golgi - <i>frc</i> mutante Embryonen zeigen Defekte in Wingless, Hedgehog und Fibroblast-Wachstumsfaktor-Signalkaskade (Selva <i>et al.</i> , 2001)	BL11484

6. ERGEBNISSE

				-Oder, aufgrund der beinahe kompletten Überlagerung der Gene -CG32174: Ubiquinon- Biosynthese	
10	17			Ribosomales Protein 18	
11	3	8933	Exd (Extradenticle)	- Homeobox-Protein -Transkriptionsfaktor -Regulation der stromabwärts liegenden Zielgene, wie <i>wingless (wg)</i> , <i>teashirt (tsh)</i> und <i>decapentaplegic (dpp)</i> -starke maternale Komponente, in späteren Stadien im Gehirn und ZNS (BDGP Daten)	BL29338
12	50	17211		-unbekannte Funktion	
13	59	32066		-unbekannte Funktion -maternale Komponente, ab zellulärem Blastoderm nicht im Embryo transkribiert (BDGP Daten) -Oder, aufgrund der kompletten Überlagerung der Gene CG14153: unbekannte Funktion	BL16746
14	93 33	6546	Bap55 (Brahma associated protein 55kD)	-Ko-Aktivatoren der Transkription -positive Regulation der Gen-Stilllegung durch miRNA -Aktin-ähnliches Protein, der in <i>Drosophila</i> an den Brahma (BRM) Chromatin-Umstrukturierungskomplex bindet -maternale Komponente, potentielle mesodermale Transkription in frühen Stadien (BDGP Daten)	BL31708
15	102	7467	Osa	-Antagonist des <i>wingless</i> Signalwegs -involviert in embryonale Segmentierung	BL3616
16	111	CR 32777	Rox1	-Dosiskompensation durch die Hyperaktivierung des X-Chromosoms	
17	14	16982	Ef2b (Elongation factor 2b)	-Elongationsfaktor -Elongation und Organisation des mitotischen Spindelapparates -In Eukaryoten: Katalyse der GTP-abhängigen ribosomalen Translokation	BL21351
18	15	4264	Hsc70-4 (Heat shock protein cognate 4)	-konstitutiv exprimierter Mitglied der Hsp 70-Chaperon-Familie -Katalyse der Entmantelung der Clathrin-bedeckten Vesikel -involviert in Neurotransmitter- Endozytose (Bronk <i>et al.</i> , 2001)	BL5846
19	23	2103	Pgant6 (Polypeptide GalNAc	Polypeptid-N-acetylgalactosaminthyltransferase	BL32463

6. ERGEBNISSE

			<i>transferase 6)</i>		
20	36			Mitochondriales Genom	
21	54	5753	Stau (Staufen)	-mRNA 3'UTR-Bindung -starke maternale Komponente, in späteren Stadien hoch transkribiert in ZNS (BDGP Daten)	BL1507, BL31247
22	56+ 31	2507	Sas (Stranded at second)	-putativer Rezeptor an der Oberfläche der Epidermiszellen -benötigt für larvale Entwicklung (Schonbaum <i>et al.</i> , 1992) -Protein: Fibronectin TypIII- Domäne, IG-ähnliche Faltung	BL2098
23	11		RpS20	Ribosomales Protein	
24	44			Mitochondriales Genom	
25	122	10756	Taf13 (TBP-associated factor 13)	-Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerase II	
26	45	1560	Mys (Myospheroid)	-β-Integrin -Teil des heterodimeren Adhäsionsrezeptors Integrin -Steuerung der Ligand-abhängigen Endozytose -Rac1-GTPase interagiert mit Mys und ist für dessen Lokalisation zuständig (Xavier und Williams, 2011) -Protein: extrazelluläres EGF, intrazelluläre Plexin-ähnliche Faltung	BL59
27	32		RpS10b	Ribosomales Protein	
28	43	3576	Schlank	-Mitglied der Ceramide-Synthase-Familie -Transmembranprotein, welches in die Biosynthese von Sphingolipiden involviert ist -Wachstumsregulation in <i>Drosophila</i> (Bauer <i>et al.</i> , 2009)	
29	38		RpS10b	Ribosomales Protein	
30	57	7917	Nucleoplasmin	-Mitglied der Chaperon-Familie -Regulation der Nukleosom-Assemblierung	
30	8		DmGlut (Dietary and metabolic glutamate transporter)	-Glutamat-Transmembran-Transporter	
31	97			Ribosomales Protein	

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den durchgeführten Screens sowohl für Rac1, als auch für Rac2 mögliche Interaktionspartner identifiziert wurden. Im Fall von Rac1 können die putativen Kandidaten an der Myoblastenfusion beteiligt sein. Bezüglich der Kandidaten für Rac2 ist das Zusammenspielen noch nicht klar und sollte in Zukunft geklärt werden. Da es mit dem aktivierten Formen der Rac GTPasen gescreent wurde, wäre zu erwarten, dass die GAP-Proteine unter den putativen Kandidaten sind; dies war jedoch nicht der Fall. Aus diesem Grund wurden im Weiteren bekannte GAPs auf ihre potentielle Funktion während der Myoblastenfusion analysiert.

6.3.6 Analyse der in *Drosophila* identifizierten Rho GAP-Proteine bezüglich deren Funktion bei der Myogenese

Die Rho GTPasen-Proteinfamilie, zu welcher auch Rac1 und Rac2 gehören, steht im Zusammenhang mit beinahe allen fundamentalen zellulären Prozessen. Sie funktionieren als molekulare Schalter, welche zwischen der aktiven GTP-gebundenen und der inaktiven GDP-gebundenen Form rotieren. Der GDP-GTP Wechsel wird durch drei Proteinfamilien streng reguliert: den GEFs, den GAPs und den GDIs (guanine nucleotide-dissociation inhibitors). Bezüglich der *Drosophila* Myoblastenfusion konnte der GEF Myoblast City (Mbc) identifiziert werden, der in FCMs mit Rac1 interagiert und dessen Aktivierung begünstigt (Haralalka *et al.*, 2011). Daher ist es ebenfalls von besonderem Interesse GAPs zu identifizieren, die während dieses Prozesses an die aktive Form von Rac GTPasen binden, um diese zu inaktivieren. Das *Drosophila* Genom beherbergt ca. 20 Gene, die als RhoGAP-Domäne-tragende Proteine diagnostiziert wurden (Billuart *et al.*, 2001); fünf davon wurden im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert: Tumbleweed (Tum), RhoGAP84C, RhoGAP5a, dCdGAPr, und Vilse (Tabelle 6.3). Zusätzlich wurde eine Mutation eines GDis auf Fusionsstörungen hin analysiert (Tabelle 6.3, grau hinterlegt).

Tabelle 6.3: **Zusammenstellung der fünf analysierten RhoGAPs, die für *Drosophila melanogaster* als funktional identifiziert worden sind** (Billuart *et al.*, 2001). Die grau hinterlegte Zeile umfasst einen zusätzlich analysierten GDI.

RhoGAPs	Beschriebene Funktion	Analysierte Fliegenlinien	Phänotyp der analysierten Linien
Tumbleweed (Tum)/ DRacGAP/ RacGAP50C	-in <i>Drosophila</i> Flügel- Imaginalscheiben: 1. Negativer Regulator von Rac1 und Cdc42 2. reduzierte Tum-Aktivität und induzierte Rac1-Expression verursachten ähnliche Defekte 3. Interaktion mit Rac, Cdc42 und Pak	tum ^{AR2} (EMS- Mutante, loss- of-function) tum ^{DH15} (EMS- Mutante, loss- of-function) RNAi-Linie: P(GD7990) v7145	Löcher in der ventralen Muskulatur, teilweise unfusionierte Myoblasten und Dorsalschluss- defekte

6. ERGEBNISSE

	(Sotillos und Campuzano, 2000)		
RnRacGAP/ RacGap84C	-Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts durch Expression im zellularisierenden Embryo (Agnel <i>et al.</i> , 1992; Guichard <i>et al.</i> , 1997)	-----	-----
RhoGAP5a	-Adherens Junctions Regulator -Regulation der Zell-Zell-Adhäsion (Bruinsma <i>et al.</i> , 2007)	RNAi-Linie: P(TRiP.JF016 56)attP2	dem Wildtyp – ähnlicher Phänotyp
dCdGAPr	-Axonale Weiterleitung in retinalen Ganglion-Zellen (Murakami <i>et al.</i> , 2007)	P{EPgy2}CdG APr ^{EY13451}	dem Wildtyp – ähnlicher Phänotyp
RhoGAP93B/ Vilse	-Kontrolle der Repulsion von Roundabout (Robo) in Epithelzellen und Axonen - <i>vilse</i> Mutanten ähneln aufgrund des axonalen Phänotyps den <i>slit</i> und <i>robo</i> Mutanten (Lundström <i>et al.</i> , 2004)	RNAi-Linie: P(TRiP.JF016 60)attP2	dem Wildtyp – ähnlicher Phänotyp
GDi	-Rab-GDP-Dissoziationsinhibitor	GDi ^{AF160} (EMS-Mutante)	dem Wildtyp – ähnlicher Phänotyp

Der putativen RacGAPs Tum, zu dessen potentiellen Zielproteinen Rac1 und Cdc42 gehören, wurde erstmals in Sotillos und Campuzano (2000) beschrieben. Das hochdynamische Transkriptionsmuster ist in den früheren embryonalen Entwicklungsstadien zunächst ubiquitär, beschränkt sich jedoch in den fortgeschrittenen Stadien auf das zentrale und periphere Nervensystem. Anhand von ektopischen Expressionsstudien und Rettungsexperimenten konnte eine Interaktion mit Rac1, Cdc42 und der stromabwärts fungierenden Pak (p21-activated kinase) während der Entwicklung der Flügel-Imaginalscheiben bestätigt werden (Sotillos und Campuzano, 2000). Die Rolle von Tum während der embryonalen Muskelentwicklung wurde bisher noch nicht analysiert. Die in Abb. 6.13 (A-B) dargestellte *tum*-Mutanten (*tum*^{AR2} und *tum*^{DH15}) (Tabelle 6.3) weisen muskuläre Defekte auf. Es wird sichtbar, dass die Myotuben der lateralen Muskulatur in Mutanten entweder dünner erscheinen, Wegfindungsstörungen aufweisen oder gänzlich fehlen. Transheterozygote *tum*^{AR2/tum}^{DH15} Embryonen zeigen ebenfalls diesen Phänotyp, was bestätigt, dass der beobachtete Phänotyp auf eine Mutation des *tum*-Gens zurückzuführen ist. Die analysierte *tum*-RNAi-Linie weist nach der Mesoderm-spezifischen Expression ähnliche Störungen auf, zeigt aber zusätzlich einige unfusionierte Myoblasten und Dorsalschlussdefekte (Abb. 6.16, C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *tum* eine mögliche Funktion während der Myoblastenfusion haben könnte. Ein weiterer RhoGAP ist RhoGAP5a, dem eine Funktion bei der Regulation des Zell-Zell-Kontakts und der Stabilität der Adherens Junctions zugewiesen wird (Bruinsma *et al.*, 2007). Während der Augenentwicklung kommt es in den noch undifferenzierten interommatidialen Vorläuferzellen zu einer Regulation der Musterbildung durch das synergetische Agieren von Rac1 und

6. ERGEBNISSE

RhoGAP5a (Bruinsma *et al.*, 2007). Eine RNAi-Linie wurde in dieser Arbeit verwendet und mittels *Dicer;Mef2-Gal4* Mesoderm-spezifischen Expression phänotypisch analysiert. Hierbei konnte keine Veränderung des Muskelmusters beobachtet werden (Abb.6.16, D). Im Weiteren wurde das dCdGAPr, das im Auge an der axonalen Weiterleitung der Ganglion-Zellen beteiligt ist, untersucht (Murakami *et al.*, 2007). Die durch die Insertion eines mobilen P-Elements mutierte dCdGAPr-Linie, die Aufgrund der vorhandenen UAS-Sequenz, Mesoderm-spezifisch exprimiert werden konnte, zeigte ein wildtypisches Muskelmuster (Daten nicht gezeigt). Die fundamentale Rolle von Vilse, das zusätzlich analysiert wurde, wurde hauptsächlich für das *Drosophila* zentrale Nervensystem postuliert. Dabei verbindet RhoGTPase Rac1 die leitenden Rezeptoren, wie beispielsweise den Robo-Rezeptor, mit dem Zytoskelett (Luo, 2000). Der stimulierte Robo-Rezeptor rekrutiert und aktiviert Vilse, der seinerseits die Aktivierung von Rac1 begünstigt (Lundström *et al.*, 2004). Auch bei einer *Dicer;Mef2-Gal4* spezifischen Expression der *vilse*-RNAi-Linie konnte keine Veränderung beobachtet werden (Abb. 6.16, E). Die Analyse des RnRacGAP, dem eine Aktin-regulierende Rolle in den embryonalen Frühstadien zugewiesen wird, steht noch aus (Agnel *et al.*, 1992; Guichard *et al.*, 1997). Der zusätzlich analysierte Dissoziationsinhibitor GDi ist in *Drosophila* zusammen mit den RabGTPasen an dem vesikulären Transport während der Puppen- und Polzellbildung beteiligt (Ricard *et al.*, 2001). Da die analysierte Mutante eine wildtypische Muskulatur zeigt, hat es während der Myoblastenfusion vermutlich keine Funktion (Abb.6.16, F). Aber auch die Persistenz der maternalen Komponente sowie eine funktionell redundante Wirkung sind nicht auszuschließen.

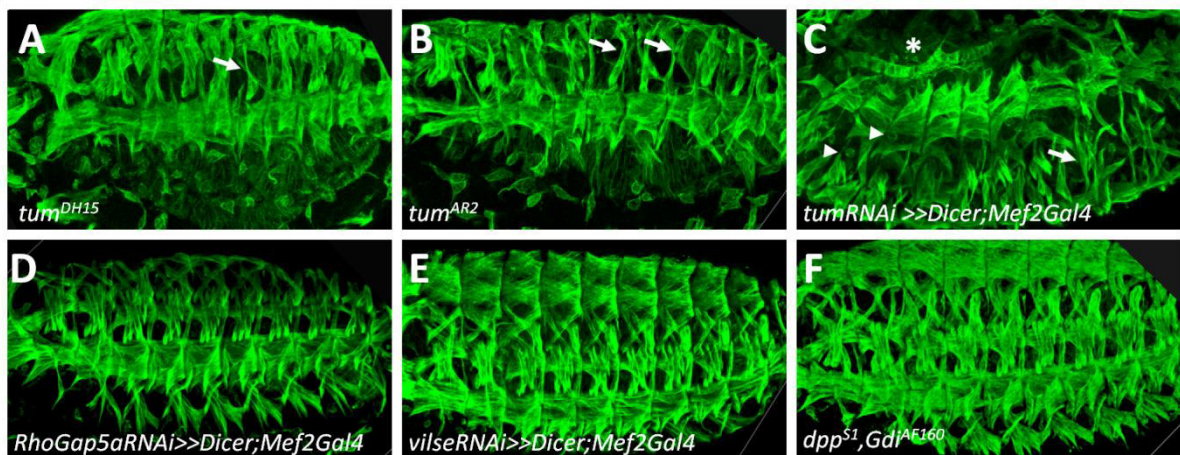


Abb. 6.16: **Phänotypische Analyse der in *Drosophila* identifizierten RhoGAPs.** Die sich im 16-ten Entwicklungsstadium befindenden Embryonen sind lateral dargestellt; die Muskulatur ist mittels einer anti- β 3-Tubulin-Färbung sichtbar gemacht worden. *tum*-Mutanten zeigen dünnere laterale Myotuben (A-C, Pfeile), Wegfindungsstörungen sowie die komplette Abwesenheit einzelner Muskeln. Die ektopisch exprimierte *tum*-RNAi-Linie zeigt zusätzlich wenige unfusionierte Myoblasten (C, Pfeilköpfe) und Dorsalschlussdefekte (C, *). Die

6. ERGEBNISSE

weiteren analysierten *RhoGAP-RNAi*-Linien (D-E) sowie die *GDI*-Mutante (F) zeigen ein wildtypisches Muskelmuster.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass die untersuchten GAPs, mit der Ausnahme von Tum, entweder keine Funktion während der Muskelbildung von *Drosophila* haben, oder in funktioneller Redundanz mit anderen GAP-Proteinen wirken. Weiterhin ist die mögliche Präsenz von maternalen Komponenten der GAPs zu berücksichtigen. Dieser Nachweis der ubiquitären Transkriptlokalisation in den embryonalen Frühstadien wurde beispielsweise für *vilse* bereits beschrieben (Lundström *et al.*, 2004).

Der geregelte Ablauf der Aktivierung bzw. der Inaktivierung der Rac-GTPasen über GEFs und GAPs ist für die weitere Rac-basierte Steuerung des Scar-Komplexes von enormer Bedeutung. Wie aber erfolgt die Interaktion der kleinen GTPasen mit dem Scar-Komplex: direkt über das Scar-Protein, oder über die andere Komplex-Komponente? Dieser Fragestellung wird im nächsten Abschnitt nachgegangen.

6.3.7 Die GTPase Rac interagiert vermutlich indirekt mit Scar/Wave

Die Ausbildung der FCM-spezifischen Aktin-Plaques an der Kontaktstelle der fusionierenden Myoblasten wird hauptsächlich durch Aktin-Nukleatoren Scar/Wave und Wasp gesteuert. Dabei wird das Scar-Protein in beiden Myoblastentypen exprimiert (Gildor *et al.*, 2009). Die Stimulation des pentameren Scar-Komplexes, bestehend neben Scar/Wave aus Sra1, Abi, Kette und Brk1 (Abb. 2.4) wird primär durch die kleine GTPase Rac1 gewährleistet. Die Rac-Bindung an den Komplex löst dessen Transinhibierung durch die Freisetzung der VCA-Domäne, die an das Arp2/3-Komplex binden und diesen aktivieren kann (Kobayashi *et al.*, 1998; Lebensohn und Kirschner, 2009). Da die Lokalisation des Scar/Wave-Proteins in den *rac1¹¹*, *rac2^A*, *mtf^A*-Triplemutanten gestört ist, kann zusätzlich postuliert werden, dass Rac für die Rekrutierung von Scar/Wave an die Fusionsstelle essentiell ist (Gildor *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, inwiefern Rac1 direkt mit Scar/Wave interagieren kann, wird zunächst das MATCHMACKER Two-Hybrid System 2 verwendet. In diesem Fall wird die aktivierte *rac1V12*-Form in pGilda-Hefevektor kloniert und zusammen mit *scar-fl pB42AD* in die Zellen eingebracht. Als Kontrolle wird die von mir durchgeführte und in Kaipa *et al.* (2013) publizierte Interaktion zwischen Scar/Wave und Dock genutzt; hierbei interagiert Dock mit vollständigem Scar/Wave-Protein (Positivkontrolle), während die isolierte Prolin-reiche Region des Scar/Wave-Proteins keine Interaktion mit Dock zeigt (Negativkontrolle) (Kaipa *et al.*, 2013). In diesem Versuch konnte keine Rac1V12-Scar/Wave-Interaktion nachgewiesen werden (Abb.6.17, 3).

6. ERGEBNISSE

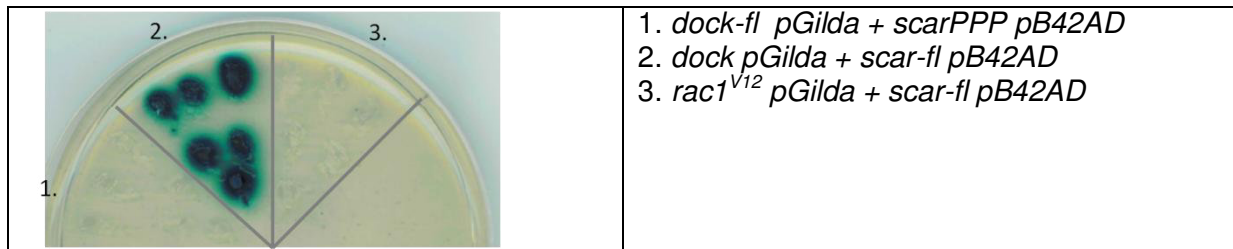


Abb. 6.17: **Die aktivierte Form von Rac1 (Rac1V12) interagiert nicht mit Scar/Wave im Hefe-2-Hybrid System.** Die Interaktion zwischen Proteinen lässt sich anhand von Wachstum auf dem Mangelmedium sowie der Blaufärbung identifizieren. 1. Negativkontrolle, 2. Positivkontrolle, 3. Direkter Interaktionstest zwischen Rac1V12 und Scar/Wave zeigt keine Interaktion. Auf der rechten Seite sind für die Zelltransformation verwendeten DNA-Konstrukte aufgelistet.

Da das für die Interaktionsstudie verwendete Hefe-2-Hybrid System einige Schwächen aufweist, sollte das Resultat mittels einer anderen Nachweismethode verifiziert werden. Der bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsansatz wird ebenfalls zum Nachweis der Protein-Interaktion verwendet (Kerppola, 2008; Gohl *et al.*, 2010). Das Verfahren basiert auf der Komplementierung zweier Teilfragmente eines Fluoreszenzproteins, in diesem Fall YFP. Um Interaktionen zwischen Scar/Wave und Rac1, bzw. Rac2, zu analysieren, wird *scar/wave* in den pUAST-NYFP-Vektor kloniert, während *rac1* und/oder *rac2* in den entsprechenden komplementären pUAST-CYFP-Vektor eingebracht werden. Werden *Drosophila* SL2-Zellen mit den beiden komplementären Konstrukten ko-transformiert, so kommt sowohl bei Rac1 als auch bei Rac2 zur Wiederherstellung des YFP-Proteins, was auf eine Interaktion zwischen Scar/Wave und den beiden Rac GTPasen hindeutet (Abb. 6.18). Diese Interaktion scheint sich auf das Zytoplasma zu beschränken (Abb. 6.18, A'' und B''). Um zu prüfen, inwiefern es sich hierbei um eine echte Interaktion handelt wurden die Konstrukte einzeln mit den komplementären Leervektoren ko-transformiert; dies führte zu keinem Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt).

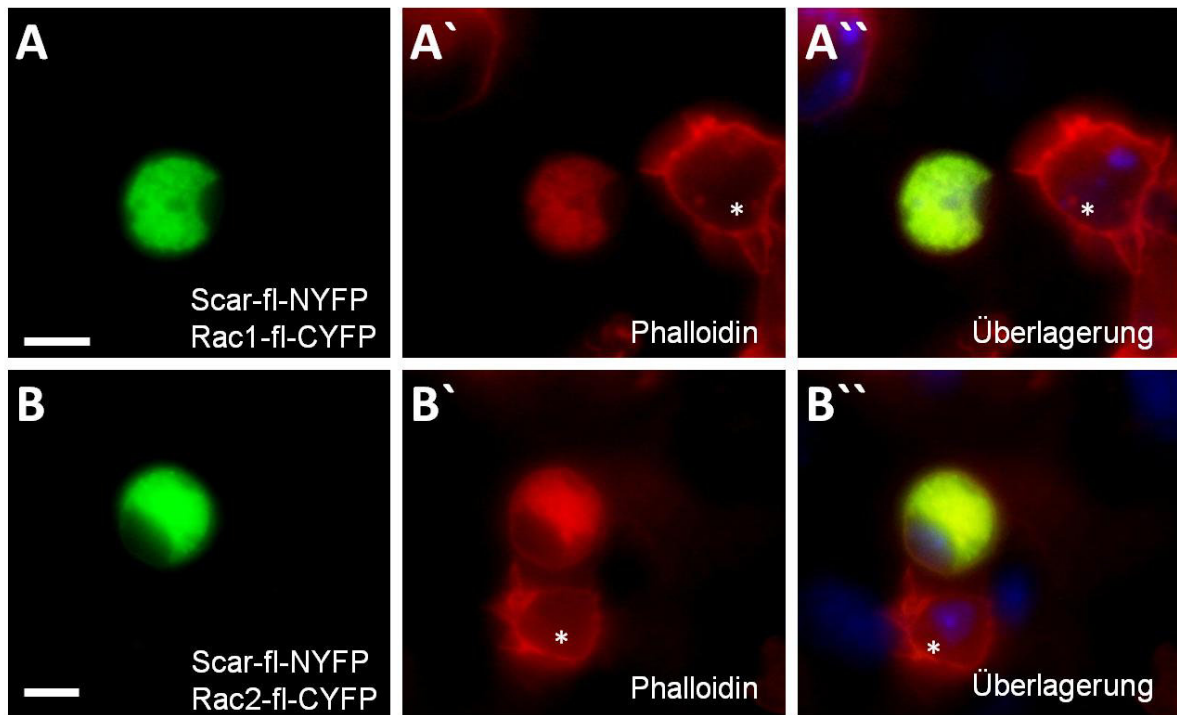


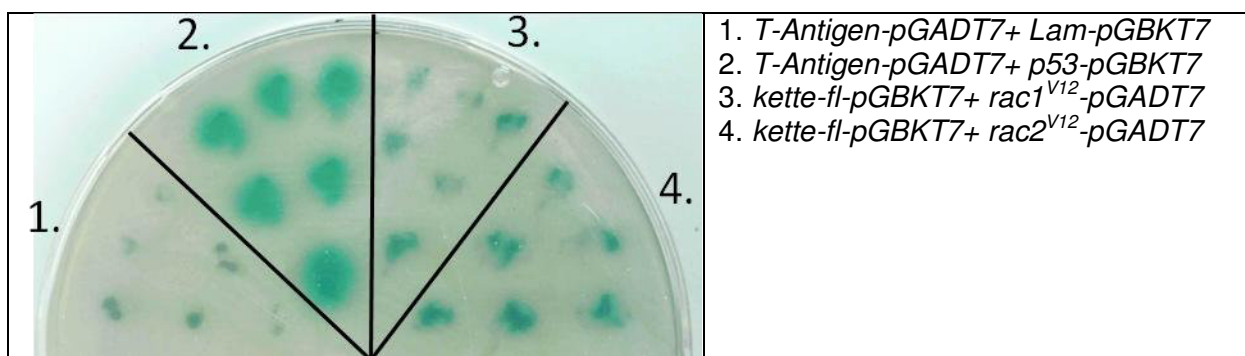
Abb. 6.18: **Nachweis der Interaktion zwischen Scar/Wave und Rac1 (A), bzw. Rac2 *in vitro* (B).** Die Interaktion ist anhand des grün fluoreszierenden Signals, welcher durch die Komplementierung zweier YFP-Teilfragmente zustande kommt, sichtbar. Die Phalloidin-Färbung markiert das Aktin-Zytoskelett (A' und B'). In der Überlagerung wird deutlich, dass die Protein-Interaktion im Zytoplasma stattfindet, während der Zellkern, angefärbt mit Hoechst (blau), proteinfrei bleibt (A'' und B''). Die Sterne markieren untransfizierte Zellen. Maßstabbalken: 10µm.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass der Scar-Proteinkomplex durchaus in der Lage ist mit Rac1 und Rac2 zu interagieren. Inwiefern das Scar/Wave-Protein selbst oder eine Komponente des Komplexes dafür verantwortlich ist, geht aus diesen Ergebnissen nicht deutlich hervor. Eine direkte Interaktion mittels Hefe-2-Hybrid System konnte nicht nachgewiesen werden und bei einer bestätigten Interaktion mittels BiFC-Assay kann es sich sowohl um eine direkte, als auch indirekte Interaktion handeln, denn die beiden YFC-Teilfragmente werden bei einer Entfernung von bis zu 7 nm rekonstruiert. Die Voraussetzung für eine indirekte Interaktion ist jedoch die endogene Präsenz intermediärer Regulatoren in der Zelle. Somit ist eine direkte Interaktion mit einem oder mehreren anderen Komponenten des Scar-Komplexes (Abb. 2.4) oder einem Linkerprotein, der zwischen Scar/Wave und Rac1 bzw. Rac2 agiert, anzunehmen. Aus diesem Grund werden im Weiteren Kette, Sra1 sowie ein putatives Linkermolekül analysiert.

6. ERGEBNISSE

6.3.8 Die Aktivierung der Scar-Komplexes wird vermutlich durch die Interaktion von redundant wirkenden Rac-GTPasen mit den Komplex-Komponenten Kette und Sra1 gewährleistet

Das *Drosophila* Kette-Protein gehört zu dem integralen Teil des Scar-Komplexes. Zusammen mit weiteren Komponenten, wie Sra1 und Abi1, kontrolliert es *in vitro* die Lokalisation und Stabilisation von Scar/Wave (Kunda *et al.*, 2003) (Abb. 2.4). Zudem stellen phänotypische und genetische Interaktionsstudien eine funktionale Verbindung zwischen Kette und SH2-SH3-Domänen Adapterprotein Dock sowie der GTPase Rac1 her, sodass eine Rac-abhängige Arp2/3-Komplex Aktivierung postuliert werden kann (Hummel *et al.*, 2000). Eine wichtige Rolle von Kette während der Myoblastenfusion von *Drosophila* wird anhand eines starken Fusionsphänotyps bekräftigt. Auf ultrastruktureller Ebene bricht das Fusionsereignis in diesen Mutanten während der Ausbildung der elektronendichten Plaques ab (Schröter *et al.*, 2004). Einen Hinweis auf das Zusammenwirken von Kette und Rac1 liefern die Rettungsexperimente während der Axiogenese; hierbei können die axonalen Wegfindungsstörungen durch die ektopische Expression der aktivierten Form von Rac1 partiell gerettet werden (Hummel *et al.*, 2000). Auch die Myoblastenfusion betreffend, konnte eine Rettung des *kette*-Phänotyps mit der wildtypischen Form von Rac erreicht werden (nicht publizierte Daten, Masterarbeit J. Hamp, 2012). Um eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen nachzuweisen wird das MATCHMAKER 3 Two-Hybrid System verwendet. Dazu werden die aktivierten Formen von *rac1* und *rac2* in *pGADT7*-Vektor kloniert und zusammen mit *kette-fl-pGBKT7* (zur Verfügung gestellt von Dr. Sven Bogdan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) in chemisch-kompetenten *AH109*-Hefestamm eingebracht. Das Wachstum auf Mangelmedium sowie die Fähigkeit α -Galaktosidase zu verwerten indizieren eine Interaktion von Kette mit beiden Racs (Abb. 6.19). Dies gibt einen Hinweis, dass die redundant wirkenden Racs über die Interaktion mit Kette den Scar-Komplex aktivieren und somit die Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisation steuern könnten.



6. ERGEBNISSE

Abb. 6.19: **Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Kette und den aktivierten Racs mittels Hefe-2-Hybrid Systems.** 1. Negativkontrolle mit dem humanen Lamin C und T-Antigen. 2. Positivkontrolle mit murinem p53 und T-Antigen. 3. und 4. Interaktion zwischen Kette und Rac1V12 sowie Rac2V12 kann anhand von Wachstum und Farbumschlag nachgewiesen werden. Rechts sind die verwendeten DNA-Konstrukte aufgeführt.

Eine weitere Scar-Komplex-Komponente, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist Sra1. Das Expressionsmuster von *sra1* kommt dem Expressionsmuster von *kette* sehr nah: das Transkript wird maternal bereitgestellt, weist in den früheren Stadien eine ubiquitäre Verteilung auf und begrenzt sich ab dem Stadium 12 auf das zentrale Nervensystem und das viszerale Mesoderm (Schenk *et al.*, 2003). Schon sehr früh konnte eine direkte Interaktion von Sra1 mit Rac1 und F-Aktin beschrieben werden. Dabei bindet es in Vertebraten an die GTP-gebundene, aktive Form von Rac1, was durch Ko-Lokalisationsstudien von Sra1 und RacV12 in Membran-„Ruffles“ bewiesen wurde (Kobayashi *et al.*, 1998). Außerdem wurde das Rac-Interaktionsbereich auf den N-terminalen Part von 407 Aminosäuren festgelegt, was auch für *Drosophila* bestätigt werden konnte. Die Interaktion mit Kette wurde anhand eines Deletionskonstrukts UAS-*sra1*- Δ -myr auf die letzten 100 C-terminalen Aminosäuren beschränkt (Bogdan *et al.*, 2004). Inwiefern Sra1 in die Myoblastenfusion involviert ist, soll im Weiteren geklärt werden. Dazu wurde zunächst das membrangebundene Sra1 in der embryonalen Muskulatur exprimiert, was zu keinen Fusionsstörungen führte (Abb. 6.20, A). Auch die Mesoderm-spezifische Expression eines RNAi-Konstrukts führte zu keiner Veränderung des wildtypischen Muskelmusters (Abb. 6.20, B).

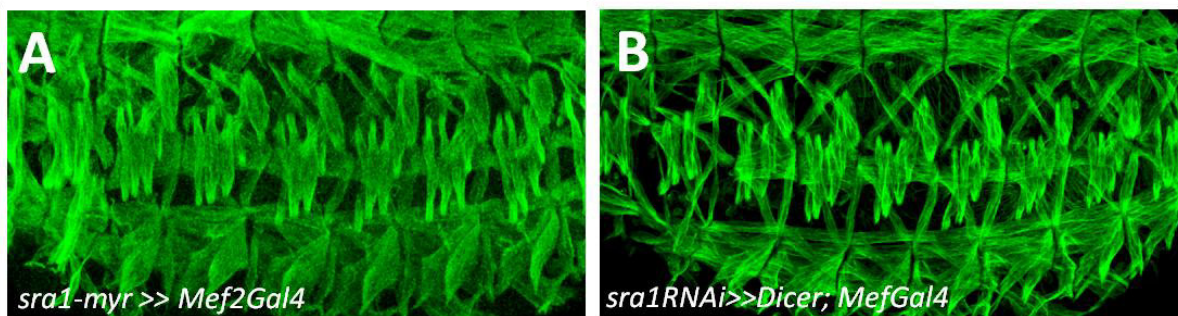


Abb. 6.20: **Die Mesoderm-spezifische Expression von *sra1-myr* sowie *sra1RNAi* erzeugt keine phänotypischen Veränderungen der embryonalen Muskulatur.** Mittels *Mef2Gal4*-Treiberlinie exprimierte UAS-*sra1-myr*-Konstrukt (A) und *sra1-RNAi*-Linie (B).

Ein im Folgenden durchgeführtes Rettungsexperiment gibt einen Hinweis auf das Zusammenwirken von Sra1 mit den redundant agierenden Rac1 und Rac2 in einem Signalweg. Dazu wurde im ersten Schritt eine *rac1^{J11}, rac2^Δ, UAS-sra-myr* Rekombinante hergestellt. Das erfolgreiche Rekombinationsereignis wurde mittels PCR-Amplifikation von UAS-*sra1-myr* verifiziert, während das gleichzeitige Vorhandensein der *rac*-Doppelmutation

6. ERGEBNISSE

mittels phänotypischer Analyse der Embryonen bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe des Mesoderm-Treibers, *twist-Gal4*, wurde Sra1 spezifisch im homozygoten *rac1^{J11}*, *rac2^Δ* mutanten Hintergrund exprimiert, was zu einer deutlichen Abschwächung des Muskelphänotyps führt (Abb. 6.21, C-C'). Es ist zu erkennen, dass im 16-ten Entwicklungsstadium, trotz der immer noch vorhandenen unfusionierten Myoblasten, signifikant mehr Myotuben gebildet werden.

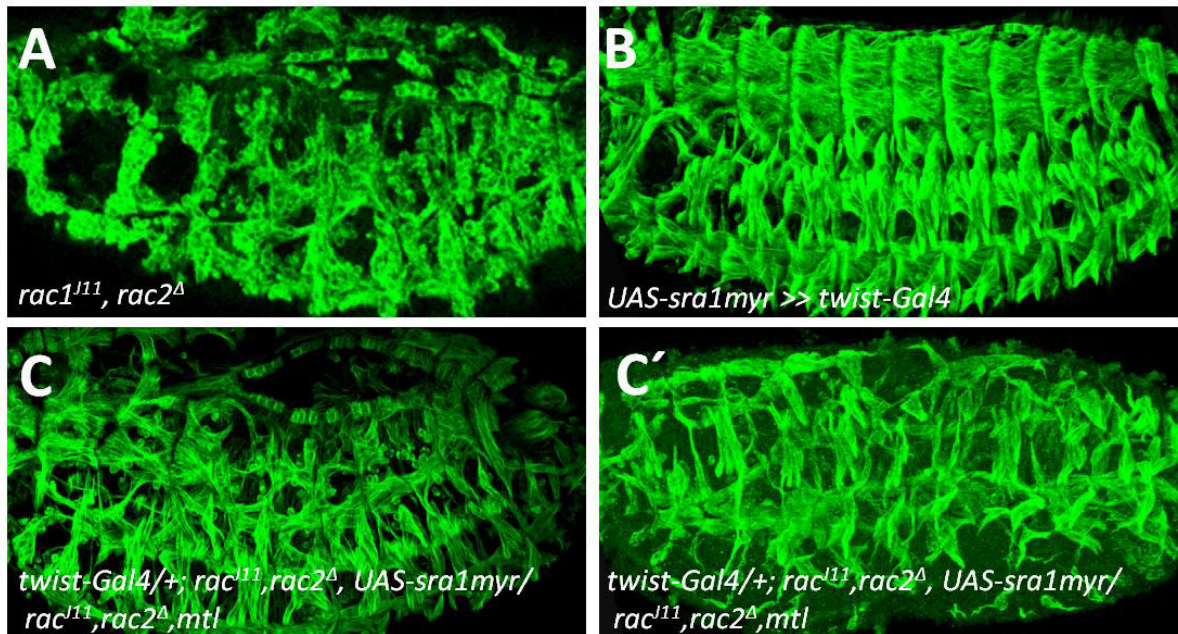


Abb. 6.21: Die Mesoderm-spezifische Expression von Sra1 ist in der Lage den *rac*-Doppelmutantenphänotyp partiell zu retten. A: *rac1^{J11}, rac2^Δ*-Doppelmutanten weisen gravierende Fusionsstörungen auf. B: Die Mesoderm-spezifische Expression des membrangebundenen Sra1 mittels des *twist-Gal4*-Treibers zeigt ein wildtypisches Muskelmuster. C-C': Die gleiche Expression in dem *rac*-Doppelmutanten-Hintergrund führt zu einer signifikanten Abschwächung des Phänotyps, was auf ein Zusammenwirken der Proteine in einem Signalweg deutet.

Im nächsten Schritt wurde der Frage nach der Aktivität eines putativen Linkermoleküls zwischen Rac1 und Scar nachgegangen. Ein möglicher intermediärer Regulator, der aus der Literatur bekannt ist, ist das IRSp53. Dieses Protein ist ein Substrat des Insulinrezeptors und konnte in Cos7-Zellen für die Ausbildung der Rac-induzierten Membran-„Ruffles“ als Linker postuliert werden. Dabei bindet das aktivierte Rac1 an das N-terminale Ende des IRSp53, während die in IRSp53 vorhandene C-terminale SH3-Domäne an Scar bindet um einen trimolekularen Komplex zu bilden (Miki *et al.*, 2000). Inwiefern das *Drosophila* IRSp53 homologe CG32082 für die Myoblastenfusion relevant ist, wurde mittels *in situ*-Hybridisierung und durch die Induktion eines Knock-downs untersucht. Die durchgeführte *in situ*-Hybridisierung ist in Abb. 6.22 dargestellt. Hierbei ist erkennbar, dass die mRNA weder in den fusionsrelevanten Stadien (Stadien 10-13, Abb. 6.22, A-B), noch in den späteren

6. ERGEBNISSE

Stadien (Abb. 6.22, C-D) Mesoderm-spezifisch transkribiert wird. Zusätzlich wurde durch die Mesoderm-spezifische Expression der dazugehörigen RNAi-Linie ein Knock-down induziert, bei dem jedoch keine Störungen der somatischen Muskulatur beobachtet werden konnten (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass dem CG32082 keine Funktion während der Myoblastenfusion zuteilwird.

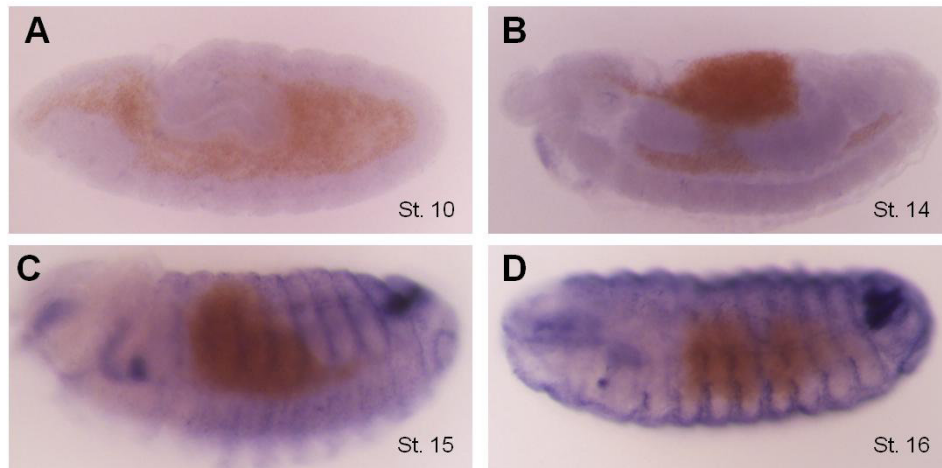


Abb. 6.22: ***In situ*-Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen zeigt keine mesodermale Transkriptlokalisierung.** Die früheren Embryonalstadien zeigen keine spezifische Färbung des somatischen Mesoderms (A-B). In den späteren Stadien ist lediglich eine epidermale mRNA-Lokalisation erkennbar.

Die erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Komponenten des Scar-Komplexes an der Fusion der Myoblasten beteiligt sind. Wie diese jedoch miteinander und mit den Rac-GTPasen zusammenspielen, um die Arp2/3-abhängigen Aktin-Polymerisation zu regulieren, ist derzeit noch unklar und bedarf weiterer biochemischer und genetischer Analysen. Neben der Aktin-Polymerisation ist der Prozess der Depolymerisation für die dynamische F-Aktin-Akkumulierung an der Seite der kontaktierenden Myoblastenmembranen von enormer Wichtigkeit. In diesem Zusammenhang wird im Weiteren auf die bekannten Aktin-depolymerisierenden Faktoren eingegangen.

6.4 Der konservierte Aktin-depolymerisierende Faktor Tsr ist während der Myogenese ubiquitär exprimiert

Die Bildung und Auflösung der F-Aktin Plaques auf der Seite der fusionierenden Myoblasten ist ein hochdynamischer Vorgang. Life-Imaging Studien konnten zeigen, dass in einigen Aktin-Mutanten, wie *rac*, *mbc*, *kette* oder *scar*^{mat/zugot} die Plaques vergrößert erscheinen (Richardson *et al.* 2007), was auf eine fehlende Depolymerisierung hindeuten könnte. Um einen Hinweis auf den Mechanismus der Plaque-Auflösung zu bekommen, wurde das evolutionär konservierte Depolymerisierungsprotein Cofilin/Twinstar (Tsr) analysiert. Um

dessen Rolle bei der Myoblastenfusion zu prüfen, wurde zunächst das Transkriptionsmuster mittels *in situ*-Hybridisierung ausgewertet. Die *tsr* mRNA wird maternal bereitgestellt und weist während der gesamten Embryonalentwicklung eine ubiquitäre Lokalisation im Mesoderm auf (Abb. 6.23, Pfeile). In meiner Masterarbeit konnte ich zeigen, dass *tsr*-Nullmutanten keine Störungen der Myoblastenfusion zeigen, was auf die maternale Komponente zurückzuführen ist (Abb. 6.23, A, G). Diese ist noch bis zum Stadium 13 detektierbar (Masterarbeit, T. Trinkewitz, 2010), wo bereits die zweite Phase der Myoblastenfusion initiiert wird (Beckett und Baylies, 2007). Zudem bedingt die Mesoderm-spezifische Expression der konstitutiv-aktiven (TsrS3A) sowie der dominant-negativen (TsrS3E) Form von Tsr ebenfalls keine phänotypische Veränderung der embryonalen Muskulatur (Masterarbeit, T. Trinkewitz, 2010).

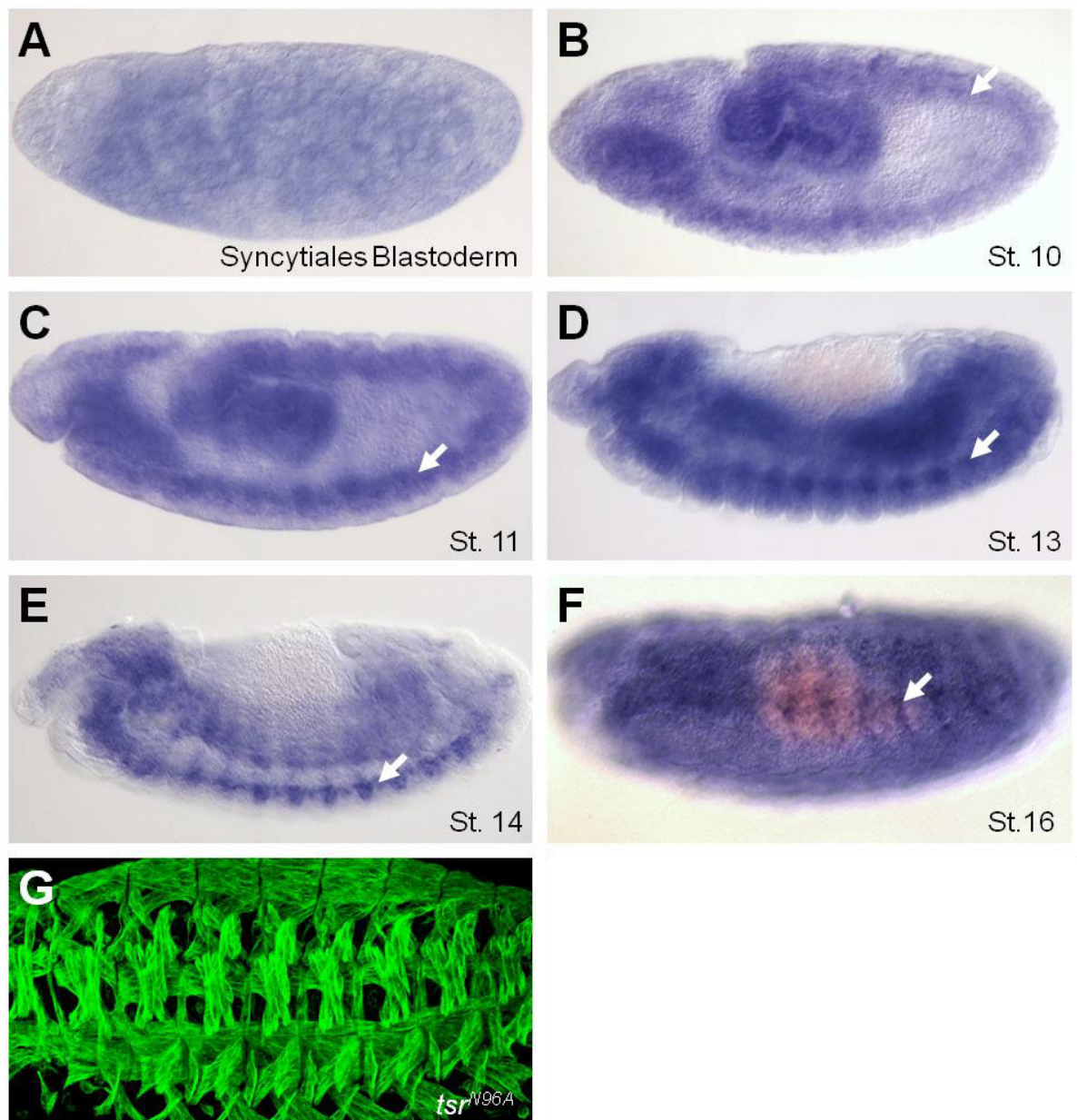


Abb. 6.23: *In situ*-Hybridisierung mit der *tsr*-spezifischen Sonde indiziert die Transkription im Mesoderm während der fusionsrelevanten Stadien. Laterale Ansicht der unterschiedlichen embryonalen Entwicklungsstadien, die mit Hilfe der NBT-BCIP Reaktion angefärbt wurden um die Lokalisation der mRNA zu visualisieren. (A) *tsr* wird maternal übertragen. In den früheren Stadien ist das Transkript ubiquitär nachzuweisen, auch im frühen Mesoderm (B-C, Pfeile). Ab dem 13-ten Stadium lokalisiert die mRNA spezifisch im somatischen Mesoderm, was anhand eines repetitiven Musters sichtbar wird (D-F, Pfeile). Die *tsr*^{N96A}-Nullmutanten weisen keine Störungen der somatischen Muskulatur auf (G).

Der konservierte Regulationsprozess von Cofilin basiert auf dessen Phosphorylierung. In Säugetierzellen ist die Aktivität des Proteins durch die Phosphorylierung an dem dritten Serin inhibiert (Morgan *et al.*, 1993; Agnew *et al.*, 1995). Diese Konvertierung wird durch die LIM-Kinase bewerkstelligt, die wiederum über die Rho-Familie-GTPasen aktiviert wird (Arber *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Die Analyse der vorgeschalteten LIM-Kinase wird hier anhand

6. ERGEBNISSE

von einem induzierten Knock-down durchgeführt und deutet auf eine nicht relevante Funktion, denn die induzierte Expression der RNAi-Konstrukte im somatischen Mesoderm verursacht keine Defekte in der Muskulatur (Abb. 6.24, A-B). Die Phosphotase Slingshot (Ssh) ist andererseits in der Lage durch dessen Dephosphorylierung Cofilin zu reaktivieren (Niwa *et al.*, 2002; Gohla *et al.*, 2005). In *Drosophila* führt der Verlust von *ssh* zu starker Anreicherung von F-Aktin und Desorganisation der epidermalen Zellen (Niwa *et al.*, 2002). Während der Myoblastenfusion konnte ich weder bei einer Funktionsverlustmutante (*ssh*¹⁻¹¹), noch bei der mesodermal induzierten Expression des Ssh-Proteins eine deutliche Fusionsstörung beobachten. Die letz erwähnte zeigt lediglich wenige unfusionierte Myoblasten (Abb. 6.24, C-D, Pfeile). Demzufolge bleibt die Rolle der Phosphorylierung in dem Prozess der Myoblastenfusion ungeklärt.

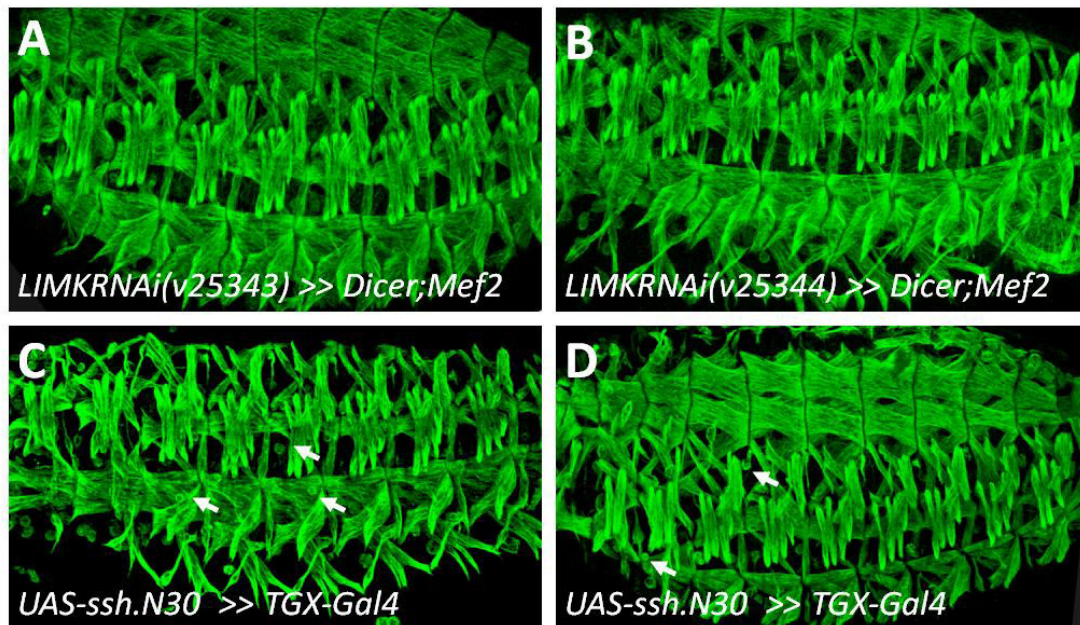


Abb. 6.24: Die Mesoderm-spezifische Expression der LIMK-RNAi-Konstrukte sowie des Ssh-Proteins zeigt keine deutlichen Fusionsstörungen. A-B: *Mef2-Gal4* getriebene Expression von zwei verschiedenen LIMK-RNAi-Konstrukten zeigt ein wildtypisches Muskelmuster. C-D: Die ektopische Expression des Ssh-Proteins mittels *Twist-Gal4* induziert wenige unfusionierte Myoblasten (Pfeile).

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass aufgrund der *in situ* Daten Tsr eine Funktion während der Myoblastenfusion haben könnte. Inwiefern dessen Phosphorylierung dabei eine Rolle spielt, muss noch weiter analysiert werden. Auch bezüglich der Involvierung in die Auflösung von Aktin-Plaques während des Fusionsvorgangs gibt es derzeit keine Evidenzen. Es ist jedoch ersichtlich, dass während der dynamischen Plaque-Bildung Aktin-Polymerisation eng mit der Depolymerisation verknüpft sein sollte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Scar-Komplex-aktivierende Rac-GTPasen in mehrere stromabwärts laufende Signalwege involviert sind; neben der Aktin-Polymerisation steht auch

6. ERGEBNISSE

Depolymerisation unter Einfluss von Rac1 (Pollard *et al.*, 2000). So soll im Weiteren geklärt werden, ob Rac1 an der Depolymerisation während der Myoblastenfusion beteiligt sein kann.

6.4.1 Die aus anderen Systemen bekannte Rac1-gesteuerte Regulation der Tsr-Phosphorylierung kann für die *Drosophila* Myoblastenfusion nicht verifiziert werden

In Zhang *et al.* (2011) wurde postuliert, dass die Regulation des Aktin-depolymerisierenden Faktors Cofilin über den Rac-gesteuerten Signalweg verläuft. Das *Drosophila* *tsr*-Gen ist für das Migrationsverhalten der sogenannten Border-Zellen innerhalb des Fliegenovars verantwortlich. Da das aktive Tsr nur an dem führenden Ende des wandernden Zellclusters benötigt wird, unterdrückt das Rac1-Signal über die Aktivierung der LIM-Kinase dessen Aktivität in den hinteren Zellen. Die Überexpression des dominant negativen Rac1 (*racN17*) hat eine komplette Inhibierung der Migration zur Folge. Diese Defekte können wiederum durch die gleichzeitige Überexpression des wildtypischen Tsr, und noch besser durch die dominant negative mutierte Form, TsrS3E, gerettet werden (Zhang *et al.*, 2011). Inwiefern dieser Zusammenhang auch während der *Drosophila* Myoblastenfusion besteht, wurde anhand eines komplementären Rettungsversuchs überprüft. Hierbei wird die dramatische Störung der Myoblastenfusion, erzeugt durch die Expression von RacN17, nicht durch die zusätzliche Expression der phospho-mimetrischen Form von Tsr, TsrS3E, verbessert, was die Rac1-gesteuerte Cofilin-Phosphorylierung unwahrscheinlich macht (Abb. 6.25).

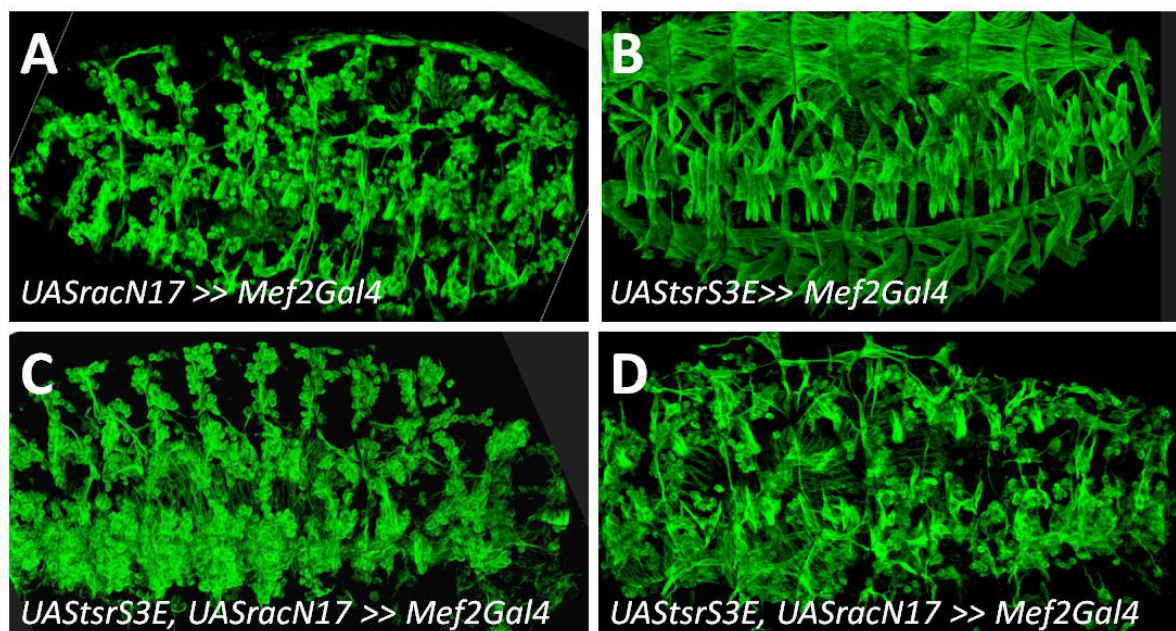


Abb. 6.25: Die Expression der dominant negativen Form von Tsr (S3E) ist nicht in der Lage den *racN17*-Phänotyp zu retten. Die Mesoderm-spezifische Expression von RacN17 zeigt Fusionsstörungen (A), dagegen scheint die Expression der phospho-mimetrischen *tsr*-Mutante keine Auswirkungen auf das Muskelmuster zu haben (B). C-D: Die für *tsrS3E* und *racN17* rekombinante Embryonen zeigen bei der *Mef2-Gal4*-spezifischen

6. ERGEBNISSE

Expression keine Verbesserung des *racN17*-Phänotyps. Die embryonale Muskulatur wurde mittels β 3-Tubulin sichtbar gemacht.

Die durchgeführten Analysen bestätigen das Zusammenwirken von Rac1 und Tsr in einem Signalweg nicht. Dennoch sollte die Aktin-Depolymerisierung bei der *Drosophila* Myoblastenfusion eine wichtige Rolle spielen. Aufgrund der phänotypisch wildtypischen *tsr*-Nullmutanten kann postuliert werden, dass die maternale Bereitstellung der mRNA dafür die Ursache ist, mehr aber, dass der Depolymerisierungsprozess um Einiges komplizierter ist und redundante Signalwege sowie Moleküle involviert. Demzufolge wurde nach weiteren Komponenten gesucht, die in diesem Prozess eine Funktion haben könnten.

6.5 Das *Aip1* homologe *flare* wird während der Embryogenese, der Oogenese, in den adulten Testes sowie in larvalen Imaginalscheiben transkribiert

Neben den regulatorischen Proteinen interagiert Cofilin/Tsr mit anderen Aktin-bindenden Molekülen. Eines der Wichtigsten ist Aip1 (actin interacting protein 1), welches in zahlreichen Modelorganismen die Cofilin-gesteuerte F-Aktin Depolymerisierung begünstigt (Okada *et al.*, 1999; 2006; Ono, 2003). Das *Drosophila* Genom besitzt nur ein *Aip1* homologes Gen: *flr* (Ren *et al.*, 2007; Garcia-Bellido und Dapena, 1974). Da es bisher nur wenig *Drosophila*-bezogene Studien für *flr* existieren, wird in dieser Arbeit zuerst eine Transkriptionsstudie durchgeführt, um die *flr* mRNA Lokalisation sowohl während der Embryogenese, als auch in larvalen und adulten Geweben nachzuweisen. Bezüglich der Embryonalentwicklung wird zunächst geklärt, inwiefern *flr* während der Myogenese in den fusionsrelevanten Stadien transkribiert wird. Die in Abb. 6.26 dargestellte *in situ*-Hybridisierung deutet aufgrund einer Färbung im syncytialen Blastoderm auf die Präsenz einer maternalen Komponente hin (Abb. 6.26, A). Beginnend mit Stadium 10 bis 13 ist eine ubiquitäre Verteilung des Transkripts erkennbar (Abb. 6.26, B-D), und erst ab dem 13-ten Stadium ist eine deutliche Anreicherung in der somatischen Muskulatur detektierbar (Abb. 6.26, E-F, Pfeile). In Stadium 16 ist eine zusätzliche Lokalisation in der pharyngealen Muskulatur sichtbar. Trotz dieser charakteristischen Verteilung der *flare* mRNA im somatischen Mesoderm, resultierte die phänotypische Analyse der verfügbaren homozygot letalen *flr*-Mutanten in keinem Fusionsphänotyp, was mit der Persistenz der maternal bereitgestellten mRNA erklärbar wäre (Abb. 6.26, G). Während die *flr³*-Nullmutanten eine wildtypische embryonale Muskulatur aufweisen, zeigen die *flr¹*-Nullmutanten geringe Fusionsstörungen (Daten nicht gezeigt). Werden die Mutanten jedoch in Transheterozygose betrachtet, so wird das wildtypische Muskelmuster wieder hergestellt (Daten nicht gezeigt), was vermuten lässt, dass der in *flr¹*-Nullmutanten beobachtete Phänotyp nicht auf eine Mutation in *flr* zurückzuführen ist. Dieser *flr¹*-Phänotyp könnte auf die Präsenz eines zweiten mutanten Hits zurückzuführen sein, aber

6. ERGEBNISSE

auch ein Funktionsgewinn wäre denkbar, was bedeuten würde, dass es sich bei *flr*¹ nicht, wie beschrieben, um eine Nullmutante handelt.

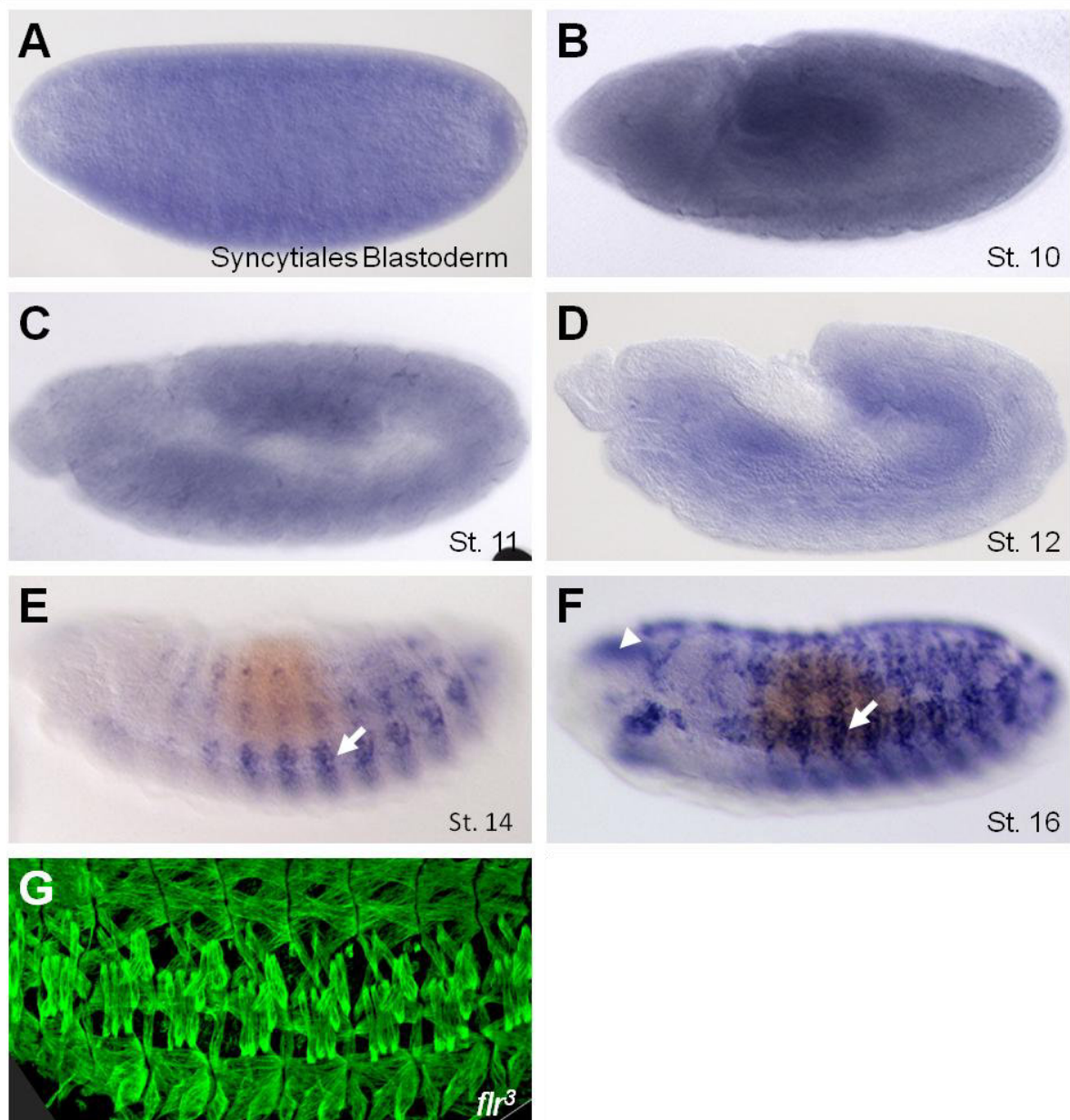


Abb. 6.26: *In situ*-Hybridisierung an wildtypischen *Drosophila* Embryonen indiziert eine Transkription von *flr* in der Muskulatur der späten Stadien. (A) Die Färbung im syncytialen Blastoderm deutet auf eine maternale Komponente hin. In frühen Stadien ist das Transkript ubiquitär detektierbar (B-D). Ab Stadium 13 ist eine spezifische *flr* mRNA-Lokalisation in der somatischen Muskulatur zu beobachten (E-F, Pfeile). Zusätzlich ist im Stadium 16 die Pharynxmuskulatur angefärbt (hier nicht im Fokus, F, Pfeilkopf). Die *flr*³-Nullmutation verursacht keine Fusionsdefekte der somatischen Muskulatur (G).

Aufgrund der wildtypischen somatischen Muskulatur der *flr*-Mutanten wurde die mögliche Funktion von Flr in anderen Geweben untersucht. Um die Lokalisation des *flr* Transkripts in larvalen und adulten Geweben zu bestimmen, wurden *in situ*-Hybridisierungen zum Einen an

6. ERGEBNISSE

larvalen Imaginalscheiben und zum Anderen an adulten männlichen und weiblichen Reproduktionsorganen durchgeführt. Die Imaginalscheiben sind epitheliale Einstülpungen, die bereits im Embryo angelegt werden. Besonders günstig lassen sich diese aus den Larven, die sich im dritten Larvenstadium befinden, isolieren. Während der larvalen Entwicklung ist die *flr* mRNA in allen vorderen Imaginalscheiben uniform nachweisbar (Abb. 6.27, A,B und C). Zusätzlich erscheint das Signal in den optischen Loben (ol) sowie im ventralen Nervensystem des larvalen Gehirns (vns) (Abb. 6.27, C).

Die Entstehung der männlichen Reproduktionsorgane der Fruchtfliege ist ein komplexer Prozess. Während die gonaden Anlagen die Testes formen, entwickeln sich aus der genitalen Imaginalscheibe in Laufe der Metamorphose die restlichen Genitalien, wie Paragonien, Samenblasen, Ductus ejaculatorius, Spermienspumpe und die Analplatte. In adulten Testes ist das Transkript ubiquitär detektierbar, was auf eine Lokalisation in frühen und in späten Spermatozyten, und auch in späten Spermatiden hindeutet. (Abb. 6.28, A). Die genannten Testes-assoziierte Reproduktionsorgane zeigen ebenfalls eine ubiquitäre Signalverteilung (Abb.6.28, A-B). Außerdem sind die inneren männlichen Genitalien von einer dünnen Muskelschicht umgeben, sodass auch diese Transkript-Lokalisation möglich wäre (Susic-Jung *et al.*, 2012). Das Ovar der Fruchtfliege besteht aus Eischnüren, den sogenannten Ovariolen. An deren Spitze sitzende Stammzellen produzieren durch differentielle Mitosen Oogonien, die die Oogenese durchlaufen. In einem genau festgelegten Teilvorgang teilt sich das Oogonium in Laufe von vier Mitosen in 16 Zellen; nur eine Zelle wird zur Oozyte, die restlichen 15 reifen zu Nährzellen heran. Der Nährzell-Oozyten-Komplex wird von somatischen Folikelpellen umgeben. Während der Oogenese wird *flr* im Zytoplasma der Nährzellen transkribiert. Sowohl die Oozyte, als auch das Folikelepithelium zeigen kein *flr*-Transkript (Abb. 6.28, C-D).

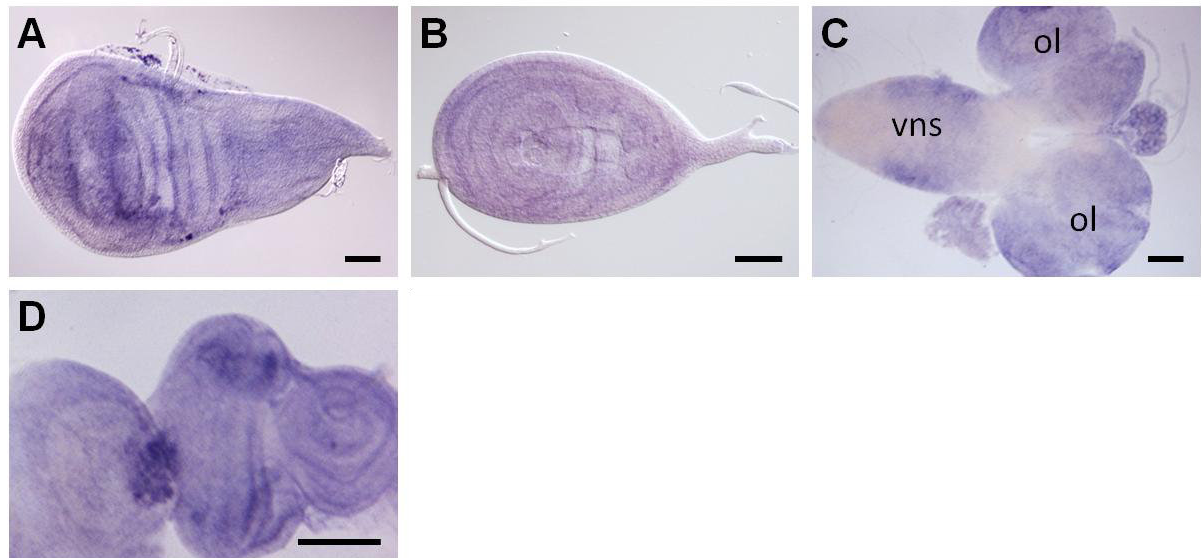


Abb. 6.27: *In situ*-Hybridisierung an larvalen Imaginalscheiben und dem larvalen Gehirn zeigt eine ubiquitäre *flr*-Transkriptlokalisierung. Die Imaginalscheiben wurden aus der vorderen Region der, sich im dritten Larvalstadium befindenden *Drosophila*, isoliert. Die gewebespezifische Lokalisation der mRNA wurde mit *flr* nachgewiesen. Flügel- (A), Bein- (B) und Augen-Antenna- (D) Anlagen zeigen eine ubiquitäre Transkriptlokalisierung. Auch in dem larvalen Gehirn (C) mit den Optischen Loben (ol) sowie dem ventralen Nervensystem (vns) ist das Transkript nachweisbar. Maßstabsbalken: 5 μ m.

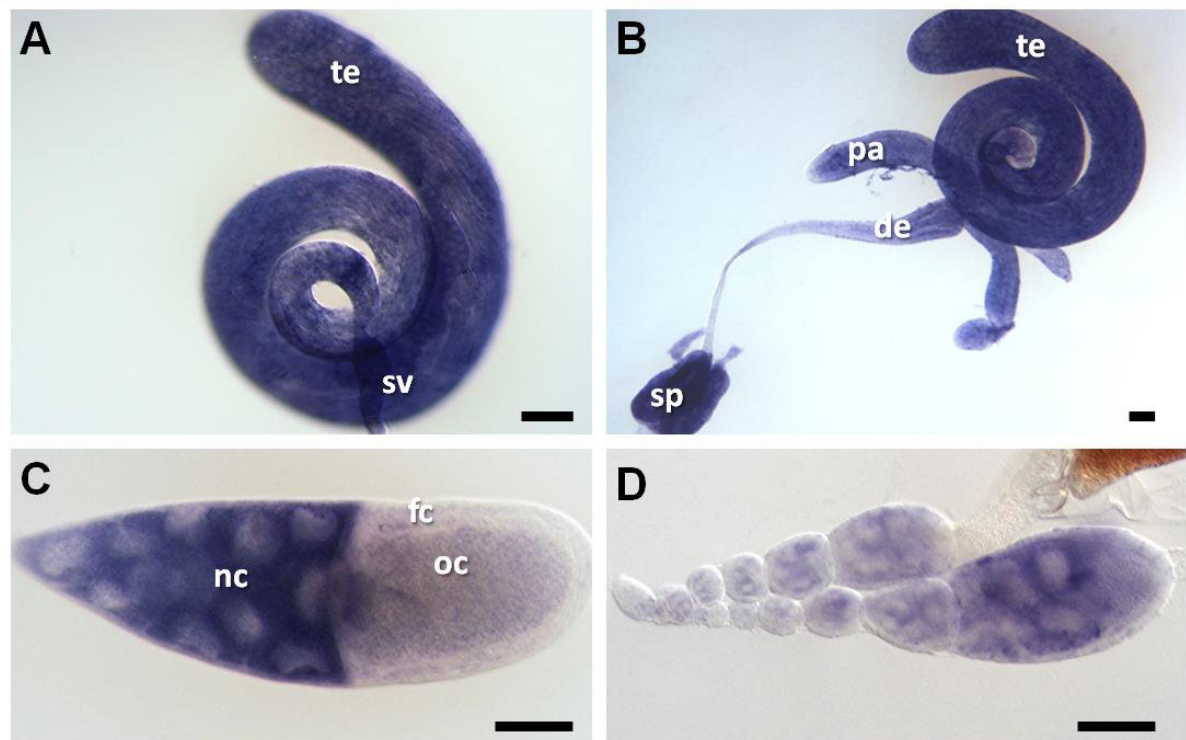


Abb. 6.28: *In situ*-Hybridisierung an *Drosophila* männlichen und weiblichen Reproduktionssystem mit *flr*-spezifischer Sonde zeigen eine Transkriptlokalisierung im Testis und in den Nährzellen der Ovarien. A: Darstellung eines Testis (te), in welchem die Präsenz des *flr*-Transkripts nachgewiesen wurde. Der Testis transkribiert *flr*-RNA uniform während aller Stadien der Spermatogenese. A-B: Ein schwächeres Signal erscheint in den Organen, die aus der Genitalscheibe entstehen: Paragonien (pa), Samenblase (sv) und Ductus (de). C: Darstellung der Nährzellen (nc) und der Eizellen (oc) der Ovarien. D: Darstellung der Eizellen (oc) und der Spermatozoen (sp).

6. ERGEBNISSE

ejaculatorius (de). Die Spermiumpumpe (sp) dagegen zeigt eine starke *flr*-Transkription. C-D: In wildtypischen *Drosophila* Ovarien ist das *flr*-Transkript schon in den frühen Stadien während der Oogenese nachweisbar. Im Stadium 10 ist *flr* im Zytoplasma der Nährzellen (nc) detektierbar. Dagegen sind die somatischen Follikelzellen (fc) und die Oozyte (oc) nicht angefärbt (C). Maßstabsbalken: 5 µm.

Aufgrund der durchgeführten *in situ* Hybridisierung ist eine Funktion von *flr* in allen untersuchten Organen anzunehmen. Dies wird im nächsten Schritt anhand der Proteinverteilung näher charakterisiert.

6.5.1 Die Expression des UAS-flare-GFP in der embryonalen Muskulatur, den dorsalen indirekten Flugmuskeln sowie in den Reproduktionsorganen zeigt eine gewebespezifische Proteinlokalisierung

Nachdem die Bestimmung der mRNA Lokalisation die embryonale Muskulatur als Wirkungsort für *flr* identifiziert hat, soll nun die Verteilung des maturen Proteins *in vivo* bestimmt werden. Da bisher kein *flr*-spezifischer Antikörper im embryonalen Gewebe generiert wurde, war ein direkter Proteinnachweis nicht möglich. Der einzige existierende polyklonale Atikörper wurde in Chu *et al.* (2012) beschrieben und für eine Western Blot Analyse verwendet. Um dieses Problem zu umgehen, wird das sogenannte Enhancer-Trap-Verfahren zu Nutze gemacht. Hierzu wird eine verfügbare Treiber-Linie eingesetzt, die das Gal4-Konstrukt in der Enhancer-Region des *flr* Gens trägt. Mit Hilfe dieser Linie wird der Ort der Expression bestimmt, während sich durch die *UAS-flr-GFP*-Linie das Produkt im *flr*-Expressionsmuster nachweisen lässt. Diese transgene Fliegenlinie trägt das GFP-markierte *UAS-flr*-Konstrukt im Genom (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Adler, University of Verginia, Charlottesville) und wurde bisher nur für die Lokalisationsbestimmung des Flare-Proteins während der Flügelzellhaarbildung verwendet (Ren *et al.*, 2007). So kommt die Expression des UAS-flr-GFP mit dem *flr*-spezifischen Treiber (*flr*-Gal4>>UAS-flr-GFP) der Bestimmung der Proteinlokalisierung mittels GFP-Nachweis sehr nahe. Für die Auswertung wurde die embryonale Muskulatur mit dem β 3-Tubulin Antikörper angefärbt, während die GFP-Markierung mittels *anti-GFP* sichtbar gemacht wurde. Das Flr-Protein wird spät während der Embryonalentwicklung exprimiert und ist erst ab dem Stadium 15 detektierbar, was mit der *in situ*-Hybridisierung korreliert (Abb. 6.29). In einer Überlagerung der beiden Färbungen wird deutlich, dass das GFP-Signal mit dem repetitiven Muster der Muskulatur übereinstimmt. Weiterhin ist dieser zu entnehmen, dass nicht alle Muskeln positiv für das Flr-Protein sind. Stattdessen lokalisiert Flr nicht in der dorsalen und nur schwach in der lateralen Muskulatur. Dagegen kommt es zu einer starken Färbung der ventralen Muskeln, mit besonderer Dominanz der VA1 und VA2 Muskeln (Abb. 6.29, in A´markiert).

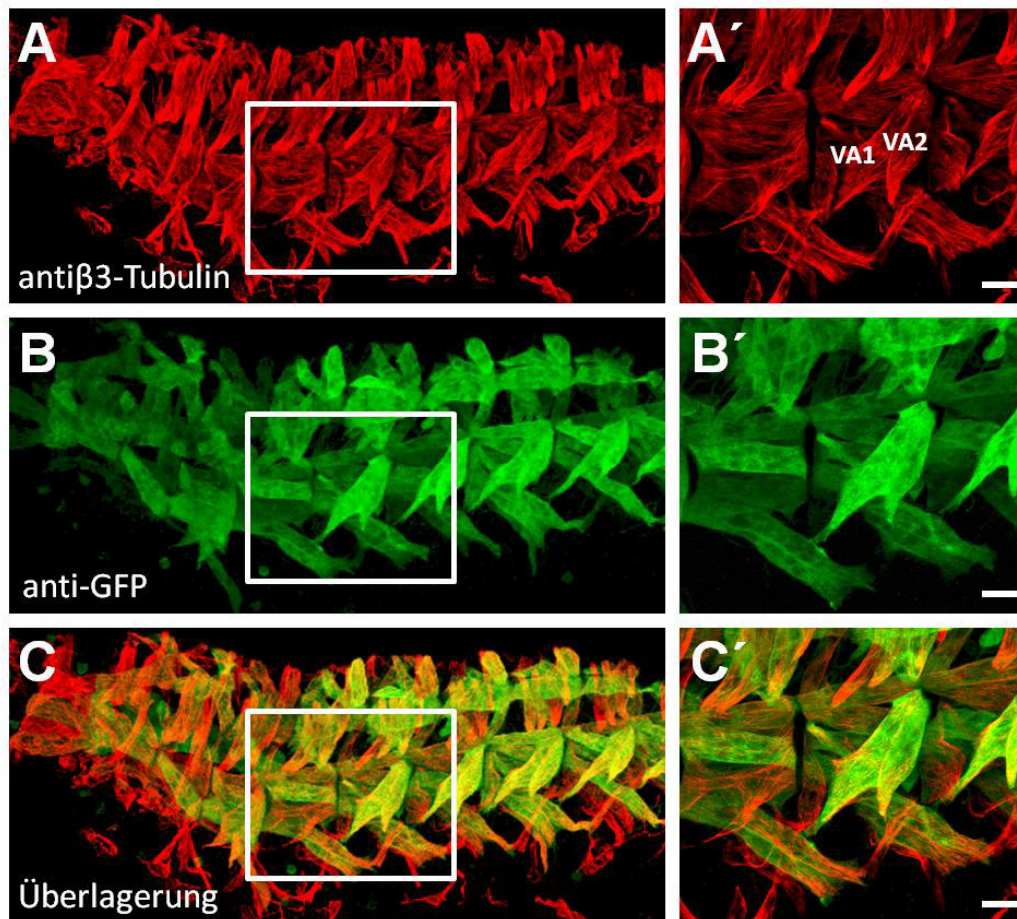


Abb. 6.29: **Nachweis der Fli-1-Proteinlokalisierung in der embryonalen Muskulatur der späten Entwicklungsstadien.** Das Fli-1-Protein ist nur in den späteren Entwicklungsstadien 15 und 16 sichtbar. Dargestellt ist ein sich im 16. Stadium befindender *Drosophila* Embryo mit wildtypischer Muskulatur. Die anti-β3-Tubulin Färbung verdeutlicht die embryonale Muskulatur (A), während das anti-GFP die Lokalisation des Fli-1-Proteins markiert (B). C: In der Überlagerung wird deutlich, dass Fli-1 in der Muskulatur lokalisiert, jedoch nicht in allen Muskeln. In den ventralen Muskeln ist das Signal am stärksten, vor allem in VA1 und VA2 (in A' markiert). A'-C': Vergrößerte Darstellung des markierten Bildausschnitts. Maßstabsbalken: 10 µm.

Um weiterhin die durchgeführte *in situ*-Hybridisierung zu vervollständigen, wurde die Bestimmung der Proteinlokalisierung auch an den adulten Reproduktionsorganen durchgeführt. Die adulten Tiere tragen jeweils eine Kopie des *UAS-fli-1-GFP*-Konstrukts und eine Kopie *fli-1-Gal4*. Durch die Expression (*fli-1-Gal4* >> *UAS-fli-1-GFP*) kann das Signal in den *Drosophila* Testes und auch in den Ovarien visualisiert werden. Der Testis zeigt eine schwache uniforme Verteilung des Proteins, was mit der *in situ*-Hybridisierung korreliert. Die Aktin-reichen Flagellen und die distale Testis-Spitze scheinen eine stärkere Akkumulation aufzuweisen (Abb. 6.30, A-A'). Eine deutliche Proteinpräsenz ist auch in der Samenbase, wo sich bereits reife Spermien befinden, sichtbar (Abb. 6.30, A, oberer Bildausschnitt). Die angegliederten Paragonien sind Anhangsdrüsen, die das, der männlichen Fertilität beitragende, Sekret liefern. Die dazu benötigten sekretorischen Zellen weisen ebenfalls eine

6. ERGEBNISSE

Flr-Expression auf (Abb. 6.30, B, Pfeilköpfe). Die weiblichen Reproduktionsorgane zeigen in den frühen Stadien einer Ovariole keine Expression (Abb. 6.30, D, Δ). Erst im 10-ten Reifestadium erscheint das Signal in den Nährzellen und noch stärker in der Oozyte selbst (Abb. 6.30, C-D). Die Oozyte weist jedoch kein mRNA Transkript vor der Translation auf, dennoch geben sowohl die Präsenz des später produzierten Proteins, als auch der mRNA Nachweis im embryonalen syncytialen Blastoderm einen Hinweis auf die maternale Komponente des *flr* Gens. Zur Kontrolle wurden auch die Tiere angeschaut, die entweder das UAS-Konstrukt, oder die Gal4-Domäne trugen. Diese zeigten kein GFP-Signal in den beschriebenen Geweben.

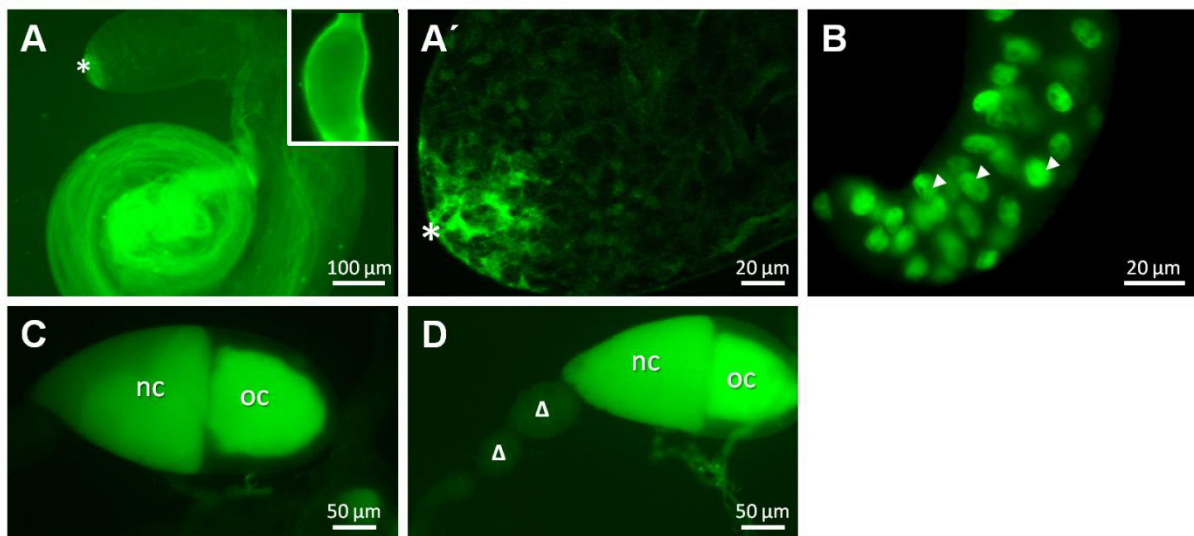


Abb. 6.30: Die Expression des GFP-markierten *flr* mit einem *flare-Gal4*-Treiber in adulten Reproduktionsorganen zeigt eine Proteinlokalisierung im Testis, in sekretorischen Zellen der Paragonien und in der Oozyte. Das GFP-Signal erscheint schwach im Testis, vor allem die Flagellen und Testis-Spitze (Hub-Region, markiert mit *) zeigen ein verstärktes GFP-Signal (A-A'). Zusätzlich ist die im Hintergrund deutlich sichtbare Samenblase stark angefärbt, diese ist oben rechts vergrößert dargestellt (A). Die Paragonien erscheinen bis auf die Markierung in sekretorischen Zellen (B, Pfeilköpfe), signalfrei. C: Das sich in Stadium 10 befindendes *Drosophila* Ei zeigt ein uniformes, nicht definiertes schwächeres Signal in den Nährzellen (nc) und eine starke Flr-Präsenz in der Oozyte (oc). Die früheren Reifungsstadien sind Protein-frei (D, Δ).

Aufgrund des Transkriptionsmusters der *flr* mRNA sowie der nachgewiesenen Proteinexpression in den männlichen Reproduktionsorganen der Fruchtfliege ist es von besonderem Interesse die Expression von UAS-*flr* in der testikulären Muskulatur zu analysieren. Diese dünne Muskelschicht, die einer äußeren Basalmembran unterliegt, umgibt die männlichen Reproduktionsorgane (siehe 2.11). Dabei konnten in Susic-Jung *et al.* (2012) drei Arten von Muskeln differenziert werden: während die Testes von einer multinukleären, glatten Muskulatur umgeben sind, sind die Paragonien und der Ductus ejaculatorius von mononukleären, gestreiften Muskeln eingefasst. Zusätzlich existieren die multinukleären

6. ERGEBNISSE

gestreiften Muskeln der Spermienpumpe. Um die Lokalisation des Flr-Proteins in der Muskulatur von Testes und Paragonien zu bestimmen, wurde der Testes-Muskel-spezifische Treiber *C855a-Gal4* verwendet (Hrdlicka *et al.*, 2002), womit die Expression von UAS-flr-GFP induziert wurde. Diese Expression des wildtypischen Flr bewirkte keine Muskeldefekte. Mit Hilfe der GFP-Markierung wird Flr in der Membran der testikulären Muskulatur identifiziert, und auch in den singulären Muskelzellen der Paragonien und in deren epithelialen Zellen. (Abb. 6.31).

Interessant ist auch die Untersuchung weiterer adulter Muskelgewebe. Dazu wurde mit der Vorläuferzellen-spezifischen Treiberlinie *1151-Gal4* die Expression des UAS-flr-GFP in der adulten Muskulatur induziert (Roy und VijayRaghavan, 1997). Auch hierbei konnte keine phänotypische Veränderung der analysierten indirekten Flugmuskulatur detektiert werden (Abb. 6.31).

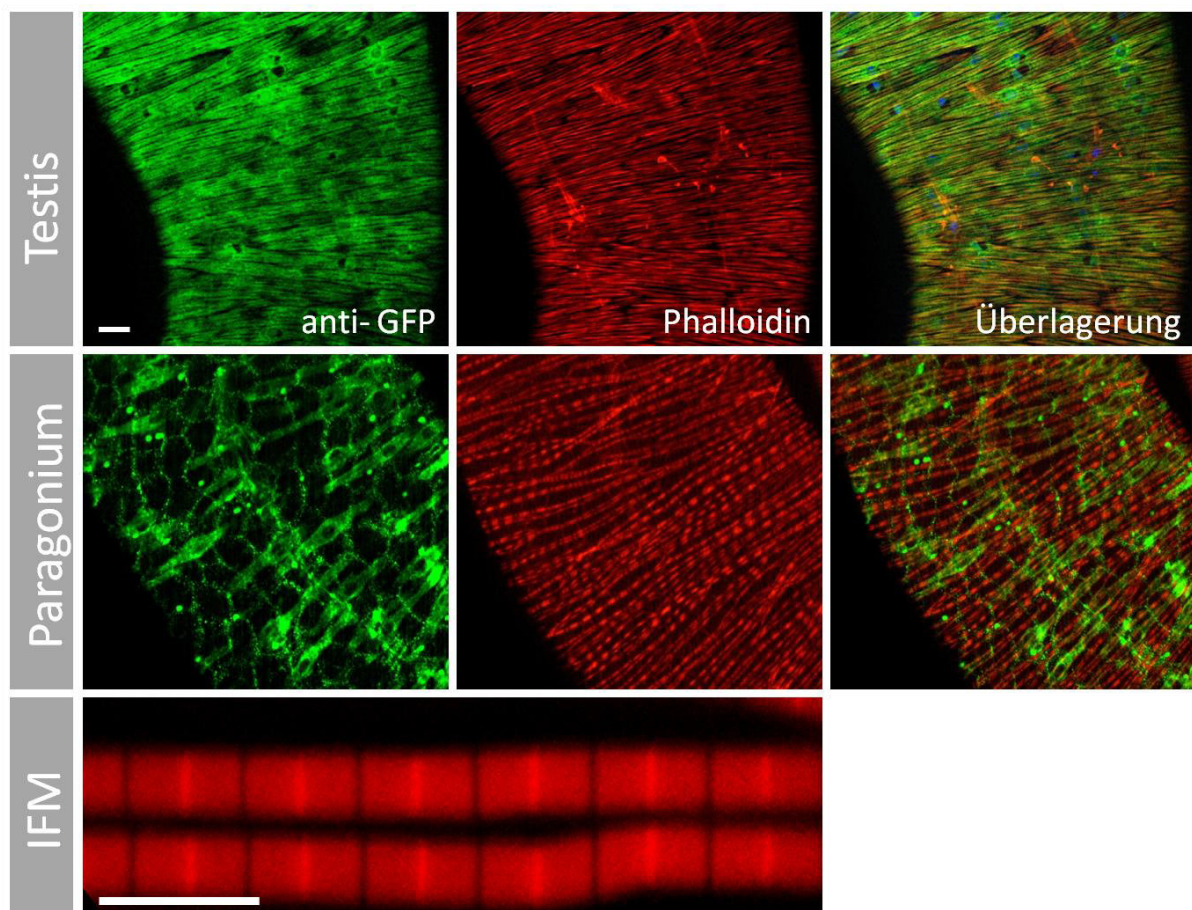


Abb. 6.31: **Flr lokalisiert in der Membran der testikulären Muskulatur sowie in einzelnen Muskelzellen des Paragoniums und in den aufliegenden Epithelzellen.** Das mit Hilfe des *C855a-Gal4* Treibers exprimierte UAS-flr-GFP ist mittels anti-GFP sichtbar gemacht worden (grün). Die gesamte testikuläre und paragoniale Muskulatur wurde mittels Phalloidin-Färbung verdeutlicht (rot). In der Überlagerung wird deutlich, dass das Flr-Signal in der Muskelschicht exprimiert wird. Maßstabsbalken: 10 μ m. Die letztlich abgebildete individuelle Myofibrille der

6. ERGEBNISSE

Drosophila indirekten Flugmuskulatur (IFM) zeigt bei der *1151-Gal4*-spezifischen Expression ein wildtypisches Z-Scheibenmuster (Wildtyp nicht gezeigt). Maßstabsbalken: 5 μ m.

Da die Expression der wildtypischen Form von Flr Defekte weder im Embryo, noch in der adulten Muskulatur verursacht hat, ist es im nächsten Schritt wichtig die Auswirkung des *flr*-Verlustes mittels RNAi-induzierten Knock-downs in diesen Gewebe zu analysieren.

6.5.2 Die Expression des *UAS-flr-RNAi* in der embryonalen Muskulatur, dorsalen indirekten Flugmuskulatur sowie in männlichen Reproduktionsorganen bewirkt keine Störungen

Der natürlich vorkommende Mechanismus der RNA-Interferenz wird hier verwendet um zielgerichtet das *flr*-Gen auszuschalten und den Effekt der sogenannten „Stilllegung“ zu beobachten. Durch die *Mef2*-Mesoderm-spezifische Überexpression wird mit Hilfe der zusätzlichen Dicer-Enzymaktivität die Umsetzung der genetischen Information über das Protein unterdrückt. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine derartige Unterdrückung von *flr* keine Auswirkungen auf die Entwicklung der embryonalen Muskulatur hat (Abb. 6.32, A). Auch die adulten Gewebe, wie die testikuläre und paragoniale Muskulatur (Abb. 6.32, B-C), sowie die dorsale indirekte Flugmuskulatur (Abb. 6.32, D), die hier analysiert wurden, weisen keine Störungen auf. Die Expression des RNAi-Konstrukts erfolgte hierbei mit einem Gewebe-spezifischen Treiber. Zusammen mit den homozygot letalen *flr*-Mutanten, die ebenfalls eine wildtypische embryonale Muskulatur aufweisen (Abb. 6. 26, G), kann einerseits eine redundante Funktion des Gens postuliert werden, andererseits sollte die maternale Bereitstellung der mRNA berücksichtigt werden. Deshalb werden im Weiteren zusätzliche depolymerisierungsfördernde Faktoren analysiert und auf dessen potentiellies Zusammenwirken anhand von Doppelmutanten geprüft.

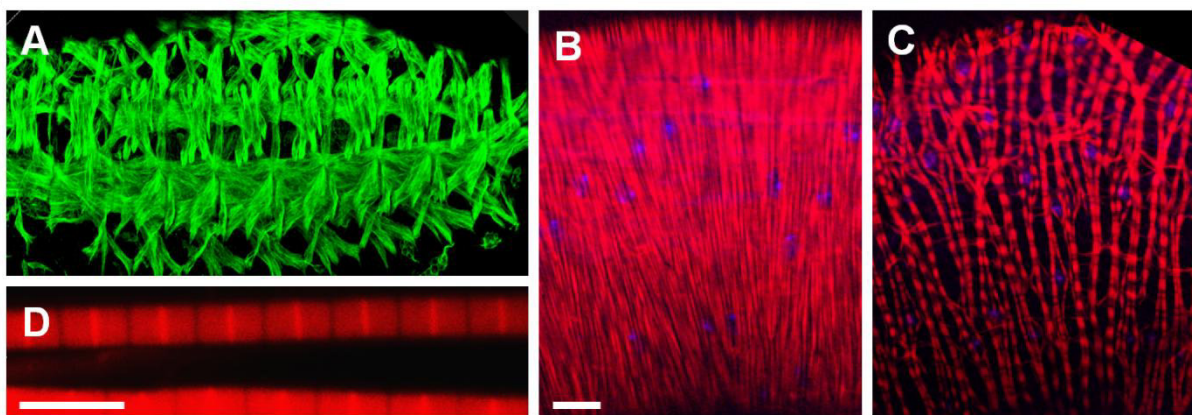


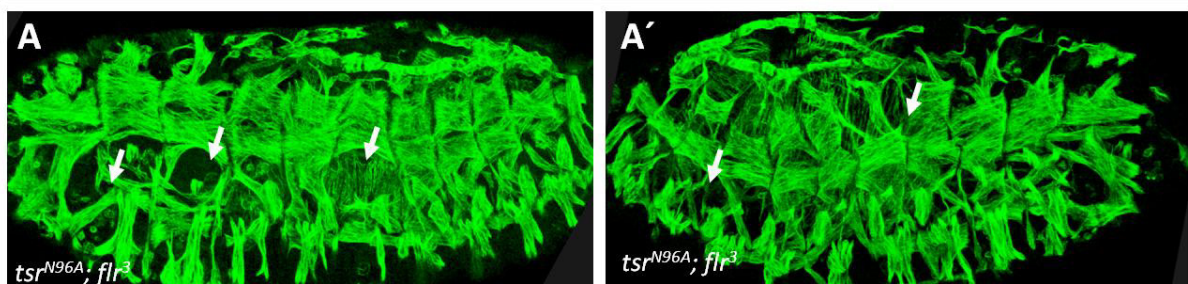
Abb. 6.32: Die induzierte Expression des *UAS-flr-RNAi*-Konstrukts in den embryonalen Myoblasten, der Muskulatur der männlichen Reproduktionsorgane sowie der adulten indirekten Flugmuskulatur bewirkt keine phänotypischen Störungen. A: Die embryonale Muskulatur zeigt nach der *Mef2-Dicer*-spezifischen

6. ERGEBNISSE

Expression ein wildtypisches Muskelmuster, das mittels anti- β -Tubulin visualisiert wurde. Die dünne Muskelschicht, die die *Drosophila* Testes (B) und Paragonien (C) umgibt, wurde nach der C855a-spezifischen Expression mittels Phalloidin-Färbung (rot) sichtbar gemacht und weist keine Störungen auf. Die Kerne der multinukleären Testismuskulatur und der mononukleären paragonialen Muskeln wurden mit einer Höchst-Färbung (blau) nachgewiesen. Maßstabsbalken: 10 μ m. Die in (D) dargestellte individuelle Myofibrille der *Drosophila* indirekten Flugmuskulatur weist bei der mittels 1151-Gal4-induzierten Expression ein wildtypisches Z-Scheiben-Muster auf (Wildtyp nicht gezeigt). Maßstabsbalken: 5 μ m.

6.6 Analyse der Aktin-depolymerisierenden Proteine und ihre potentielle Rolle bei der Auflösung der Aktin-Plaques auf der Seite der FCMs während der Myoblastenfusion in *Drosophila*

Um die Dynamik der an der Kontaktstelle der Myoblasten gebildeten Aktin-Plaques zu gewährleisten, sind Aktin-regulatorische Proteine notwendig. Dabei wird angenommen, dass Aktin-Depolymerisation eine fundamentale Rolle bei der Plaque-Auflösung spielen muss. Die Hauptkomponente der Aktindynamik-fördernden Faktoren, Tsr, scheint während der Myoblastenfusion redundant zu wirken. Auch die Deletion des Aktin-bindenden Proteins Flr, bewirkt noch keine Störungen des Fusionsvorgangs. Beide Proteine interagieren aber auf genetischer und biochemischer Ebene um gemeinsam Aktin-Depolymerisierung zu steuern (Clark *et al.*, 2006; Ono, 2001; Ren *et al.*, 2007). Das Zusammenwirken von Flr und Tsr während der *Drosophila* Myoblastenfusion wird durch die Auswertung einer Doppelmutante analysiert. Die Nullmutationen der beiden Gene bewirken keine phänotypische Veränderung der somatischen Muskulatur (Abb. 6.24, G und 6.26, G). Auch das Fehlen von beiden Proteinen in einer *tsr^{N96A}; flr³*-Doppelmutante erzeugt keine Fusionsstörungen. Allerdings ist in der dorsalen und ventralen Muskulatur die Abwesenheit einzelner oder mehrerer nebeneinanderliegender Muskeln zu beobachten. (Abb. 6.33). Trotz dieses schwach ausgeprägten Phänotyps, ist das Zusammenspiel sowie eine Redundanzwirkung der beiden Gene denkbar und erfordert vermutlich noch zusätzliche Faktoren. Demzufolge wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere phänotypische Analysen durchgeführt und zusätzliche bekannte Proteine, die in den Vorgang der Aktin-Depolymerisierung involviert sind, untersucht.



6. ERGEBNISSE

Abb. 6.33: **Die homozygoten *tsr*^{N96A}; *flr*³- Doppelmutanten zeigen keine starke Fusionsstörungen, dennoch zeichnet sich die somatische Muskulatur durch das Fehlen einzelner Muskeln aus.** Die Einzelmutanten weisen eine wildtypische Muskulatur auf (hier nicht gezeigt). Die mittels anti- β 3-Tubulin angefärbte somatische Muskulatur der sich im Stadium 16 befindenden Embryonen weist fehlende Myotuben auf, die dadurch entstandenen Löcher sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Aktinmonomer-bindende Proteine haben eine zentrale Rolle bei der Regulation der Zytoskelett-umorganisierenden Dynamik. Neben den bereits beschriebenen Chic und Tsr, bindet das ca. 40 kDa große Twf an Aktinmonomere und verhindert deren Assemblierung an das wachsende Aktin-Filament (Lappalainen *et al.*, 1998). Bezüglich der Embryonalentwicklung zeigt das hier dargestellte mRNA Expressionsmuster eine maternale Bereitstellung der mRNA, da es bereits im frühen Embryo vor Beginn der zygotischen Transkription schon vorhanden ist. Die weitere Verteilung in den frühen Stadien ist uniform. Ab dem Stadium 12, wo die Myoblastenfusion beginnt, ist keine Detektion im somatischen Mesoderm zu verzeichnen, jedoch ist das Transkript im zentralen Nervensystem zu vermuten, was mit den Daten von Wang *et al.* (2010) korreliert (Abb. 6.34, A-D). Des Weiteren zeigen die verfügbaren Nullmutanten, *twf*¹⁰² und *twf*¹¹⁰ keine Fusionsdefekte (Abb. 6.34, E-F). Auch der Versuch das gemeinsame Agieren mit *tsr* auf genetischer Ebene zu bestimmen, resultierte in einen dem Wildtyp ähnlichen Phänotyp der in dieser Arbeit generierten Doppelmutanten (Abb. 6.34, G-H). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass *twf* entweder eine weniger bedeutende Funktion bei der Myoblastenfusion einnimmt oder in Redundanz mit einem anderen Faktor wirkt.

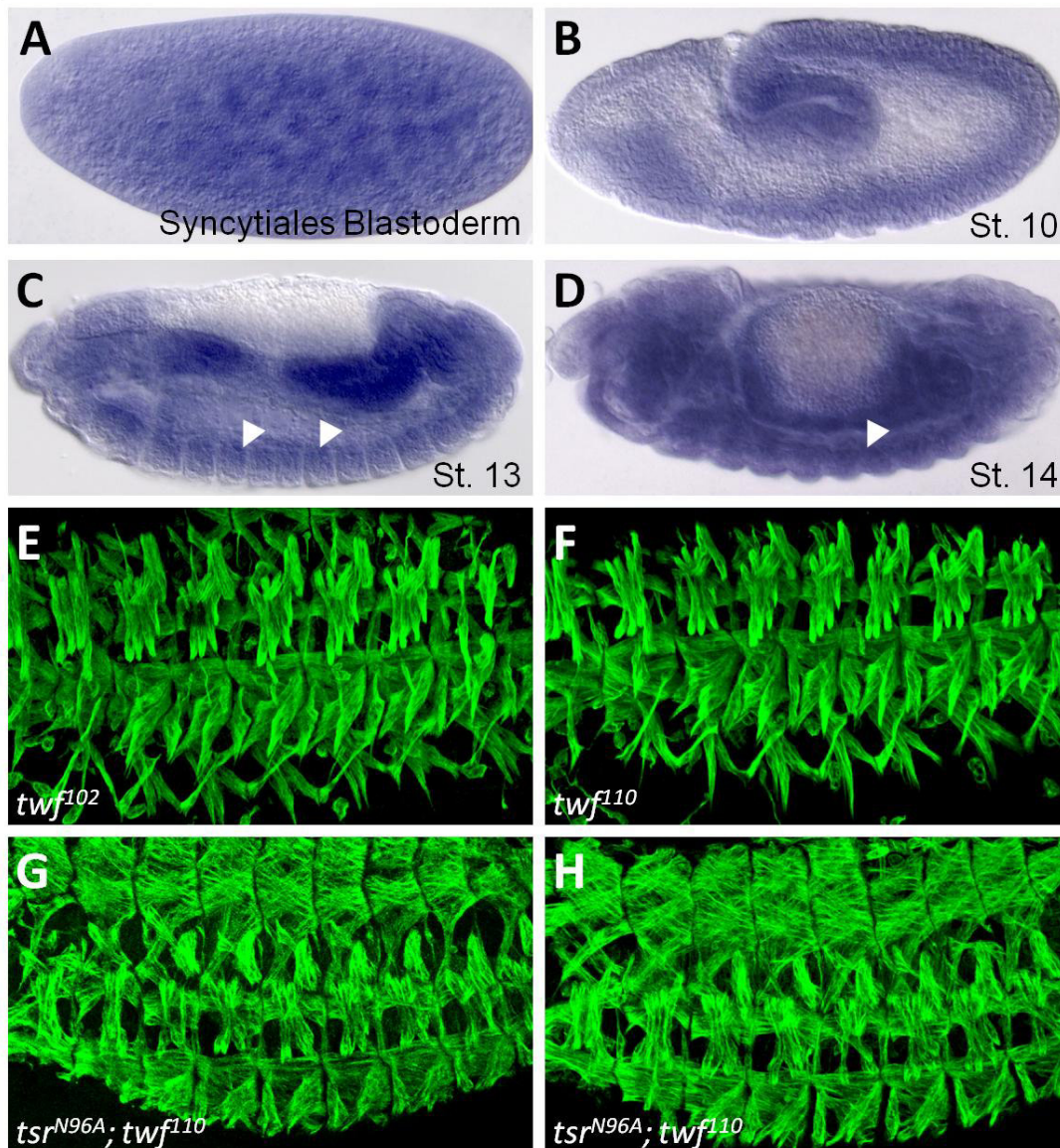


Abb. 6.34: Die Bestimmung der *twinfilin* mRNA Lokalisation sowie phänotypische Mutantenanalysen deuten auf mindere Funktion des Gens während der Myoblastenfusion in *Drosophila* hin. A-D: Die *in situ*-Hybridisierung an *Drosophila* Embryonen detektiert das *twf*-Transkript im syncytialen Blastoderm (A) und zeigt eine ubiquitäre Verteilung in weiteren Entwicklungsstadien, wobei eine Lokalisation im zentralen Nervensystem angedeutet ist (C-D, Pfeilköpfe). E-F: *twf* Nullmutanten zeigen keine Fusionsstörungen. G-H: *tsr^{N96A}; twf^{f110}* - Doppelmutanten weisen eine wildtypische Muskulatur auf.

Ein anderes Aktin-bindendes Protein, welches in Eukaryoten im Zusammenhang mit Cofilin steht, ist das Cyclase-assoziierte Protein (CAP). Mit seiner Filament polymerisierenden und depolymerisierenden Aktivität, bindet es einerseits an Cofilin um es zu recyceln (Balcer *et al.*, 2003; Moriyama *et al.*, 2002), und andererseits an G-Aktin um es in die Nähe von Profilin zu transportieren. Das *Drosophila* orthologe Protein Capulet (Capt) ist zum Einen in die Etablierung der Oozytenpolarität (Baum *et al.*, 2000), zum Anderen in die Axon-Wegfindung (Wills *et al.*, 2002) sowie in die Entwicklung des Komplexauges involviert (Firth und Baker,

6. ERGEBNISSE

2007). Die in Flybase dargestellten mRNA-Transkriptomdaten für *capt* weisen auf eine maternale Komponente und eine Lokalisation des Transkripts im frühen Mesoderm hin. In den fusionsrelevanten Stadien kann die mRNA nicht mehr Mesoderm-spezifisch detektiert werden. In Rahmen dieser Arbeit wurden die Embryonen der verfügbaren *capt*-EMS-Allele auf das Vorhandensein von Fusionsdefekten analysiert. Die beiden analysierten Nullmutanten *capt*^{E593} und *capt*^{E636} zeigen keine Defekte der embryonalen Muskulatur (Abb. 6.35, A-B). Die zusätzlich hergestellten Doppelmutanten, die aufgrund einer somatischen Rekombination weder Tsr noch Capt Proteine exprimieren, weisen ebenfalls keine deutlichen Fusionsstörungen auf. In einigen Fällen sind einige unfusionierte Myoblasten sowie Lücken in der Muskulatur zu verzeichnen, diese befinden sich jedoch eher im anterioren Bereich der lateral ausgerichteten Embryonen und sind auch für wildtypische Embryonen nicht untypisch (Abb. 6.35, C-D).

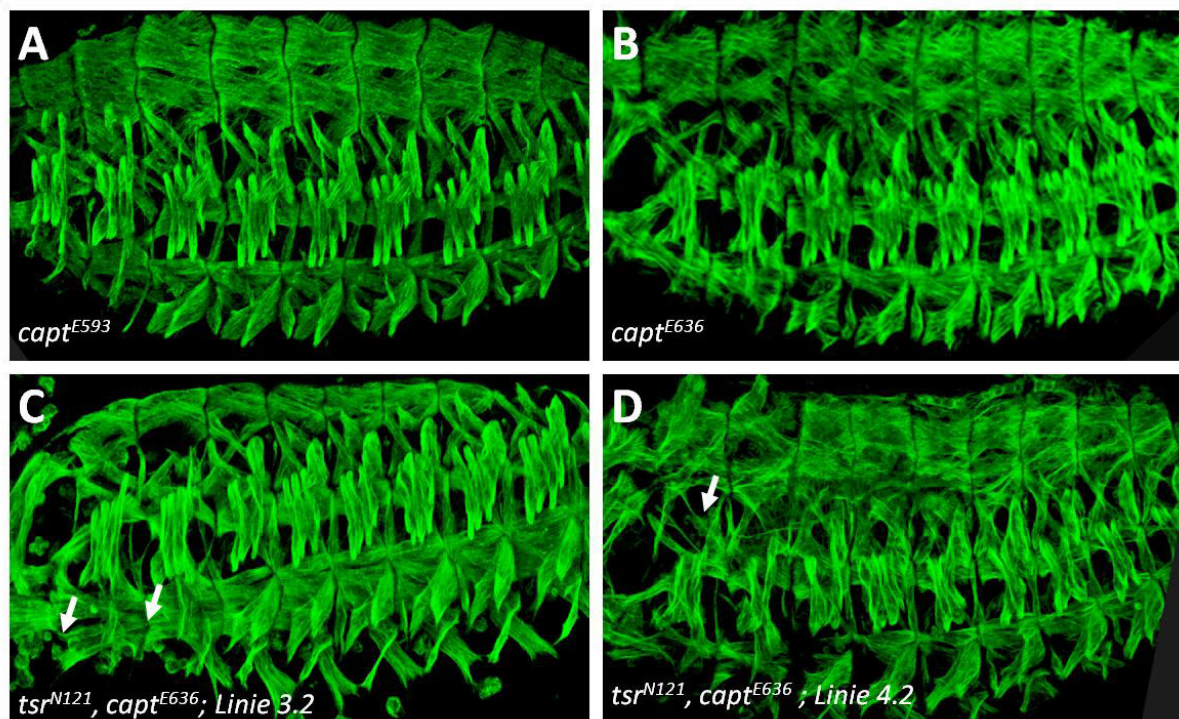


Abb. 6.35: **Phänotypische Analyse der *capt*-Mutanten zeigen keine Störungen der Myoblastenfusion.** A-D: Laterale Ansicht der mittels *anti-β3-Tubulin* sichtbargemachten embryonalen Muskulatur. A-B: *capt*^{E593} und *capt*^{E636} zeigen keine Fusionsstörungen. C-D: Im Zuge eines somatischen Rekombinationsereignis hergestellte *tsr*^{N121}, *capt*^{E636}-Doppelmutanten weisen schwache Störungen der Muskulatur im anterioren Bereich auf (C-D, Pfeile).

Die durchgeführten Analysen geben zunächst noch keine eindeutigen Evidenzen für eine Beteiligung von Tsr und weiteren möglichen beteiligten Moleküle bei der Dynamik der Plaque-Auflösung an der Seite der kontaktierenden Myoblastenmembranen. Lediglich die mögliche genetische Interaktion mit *flr* gibt ein Indiz für das Zusammenwirken der Proteine.

6. ERGEBNISSE

Da es aber noch weitere potentielle Redundanzpartner existieren, kann die Mitwirkung von Tsr an der Depolymerisation nicht ausgeschlossen werden.

7. Diskussion

Die Zell-Zell-Fusion ist ein fundamentaler Prozess bei der Entwicklung und Physiologie von multizellulären Organismen. Dabei ist beispielsweise die Fusion einzelner mononukleärer Myoblasten zu multinukleären Myotuben in *Drosophila* ein wichtiger Schritt bei der Bildung der larvalen Muskulatur. Die Myoblastenfusion basiert auf zwei Zelltyppopulationen: FCs, die die Identität der Muskeln determinieren und FCMs. Diesem Vorgang liegt ein grundlegender Mechanismus der Zellerkennung, Adhäsion, Membranverschmelzung und Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts zugrunde. Die heterologe Zelladhäsion wird von den Transmembranrezeptoren der IgSF-Proteine, die sich in einer ringförmigen Struktur an den Zellkontakt anordnen, vermittelt (Kesper *et al.*, 2007; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Önel *et al.*, 2011). Diese Proteine dienen als Plattform für die Entstehung eines signalreichen Zentrums, der den Namen FuRMAS trägt und sich durch die Ähnlichkeit zu der Immunologischen Synapse, den Podosomen oder den Invadopodia auszeichnet (Kesper *et al.*, 2007; Önel und Renkawitz-Pohl, 2009; Sens *et al.*, 2011). Eine Besonderheit der FuRMAS ist ein Aktin-reiches Zentrum, dessen Entstehung auf der Arp2/3-abhängigen Aktinpolymerisation basiert (Kesper *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Massarwa *et al.*, 2007, Berger *et al.*, 2008, Gildor *et al.*, 2009). Letzte Forschungsergebnisse zeigen, dass am Zellkontakt der fusionierenden Myoblasten auf der Seite der FCMs ein dichter F-Aktin-Plaques gebildet wird, während in den FCs/wachsenden Myotuben diesem lediglich eine dünne F-Aktin-Schicht entgegensteht (Sens *et al.*, 2010). Demzufolge ist ein geregelter Ablauf der Aktin-Polymerisation von enormer Bedeutung um den Vesikeltransport, die Bildung und die Expansion der Fusionsporen und die Integration der FCMs in die FCs oder die wachsende Myotuben zu gewährleisten. Außerdem sind die Aktin-Plaques hochdynamische Strukturen, die innerhalb einer kurzen Zeit gebildet und aufgelöst werden (Richardson *et al.*, 2007). Demnach ist die Präsenz F-Aktin-depolymerisierender Faktoren wichtig für die, durch den Membranzusammenbruch induzierte, Plaques-Auflösung. In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit auf drei Fragestellungen fokussiert: zum Einen, wie die Signalweiterleitung von den IgSF-Proteinen an die Arp2/3-vermittelte Aktin-Polymerisation erfolgt und zum Anderen, welche Proteine an der Aktin-Polymerisation und der Depolymerisation während der Myoblastenfusion beteiligt sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde auf das Adaptorprotein Dock eingegangen, das in beiden Myoblastenpopulationen Zelladhäsion und Aktin-Polymerisation verbindet. Dazu wurden die Aktin-Plaques der stark gestörten *dock, vrp1*-Doppelmutanten charakterisiert. Im Zusammenhang mit der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts wurde im zweiten Teil das

7. DISKUSSION

Aktinmonomer-bindende Protein Chic analysiert. Die generierten Doppelmutanten von *chic* mit den Komponenten der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation sowie die anschließend durchgeführten Dosisexperimente zeigen, dass Chic eine duale Funktion haben sollte. Neben der Bindung an G-Aktine ist es mit der Scar/Wave- und noch mehr mit der Vrp1/Wip-Wasp-vermittelten F-Aktin-Bildung assoziiert.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Charakterisierung der Funktionen der Rho GTPasen Rac1 und Rac2, die für die Myoblastenfusion essentiell sind und in einem GTP-gebundenen Zustand in der Lage sind den Scar-Komplex zu aktivieren. Zunächst wurde ein Hefe-2-Hybrid Screen für die aktivierten Formen von Rac1 und Rac2 durchgeführt und putative Interaktionspartner aufgedeckt. Da hierbei kein GAP Protein identifiziert werden konnte, wurden bereits bekannte *Drosophila* GAPs bezüglich deren Funktion während der Myoblastenfusion phänotypisch analysiert. Dabei wurde Tum eine mögliche Rolle bei der Muskelbildung zugewiesen. Biochemische und genetische Interaktionsstudien weisen darauf hin, dass die Bindung von Rac GTPasen an den Scar-Komplex nicht direkt über das Scar/Wave- Protein erfolgt.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Aktin-Depolymerisierung analysiert. Dabei lag der Fokus auf Flr, das in *Drosophila* und auch in anderen Modellorganismen die depolymerisierende Aktivität von Tsr unterstützt. Hierbei konnte während der Embryogenese eine Muskel-spezifische Lokalisation des *flr*-Transkripts ermittelt werden. Zudem kann Flr anhand einer beobachteten genetischen Interaktion als Redundanzpartner für Tsr vorgeschlagen werden.

7.1 Das Adaptor-Protein Dock ist an der Aktivierung der Signalkaskade, die in eine Arp2/3-basierte F-Aktin-Polymerisation in FCs und FCMs mündet, beteiligt

In Vertebraten sind die orthologen Komponenten der IgSF-Proteine, Nephs und Nephrin, an der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere der Niere beteiligt. Seitdem bekannt ist, dass diese konservierte Moleküle an SH2-SH3-Domänenproteine, wie beispielsweise Nck, binden, war es von besonderem Interesse die Rolle des *Drosophila* Nck Homologen Dock während der Myoblastenfusion zu ermitteln (Jones *et al.*, 2006; Garg *et al.*, 2007). In einer kürzlich publizierten Studie wurde Dock als ein vermittelndes Protein zwischen den Ig-Transmembranrezeptoren und NPFs identifiziert (Kaipa *et al.*, 2013). Dabei konnte unter anderen eine genetische und biochemische Interaktion von Dock mit Scar/Wave und Vrp1/Wip nachgewiesen werden. Um diese Interaktionen auf der Ebene der Aktin-abhängigen Myoblastenfusion näher zu charakterisieren, habe ich die bereits vorhandenen

7. DISKUSSION

dock, vrp1 und *scar, wip* Rekombinanten auf Störungen der Aktin-Plaques-Bildung analysiert. Die homozygoten *dock*-mutanten Embryonen weisen ein dem Wildtyp entsprechendes Muskelmuster auf. Dagegen zeigen die *dock, vrp1*-Doppelmutanten eine Verstärkung der Fusionsstörungen im Vergleich zu dem *vrp1*- Einzelmутantenphänotyp. Interessant ist, dass in diesen stark fusionsgestörten Mutanten die FCM-spezifischen F-Aktin-Plaques noch gebildet werden. Zudem deutet eine geweitete Zellkontaktstelle darauf hin, dass in diesen doppelmutanten Embryonen eine Auflösung der Aktin-Plaques erreicht werden kann. Diese Studien sind in Kaipa *et al.* (2013) eingegangen. Die beobachteten Plaques könnten mit der Präsenz anderer SH2-SH3-Adaptorproteine in Verbindung gebracht werden. Dafür ist in FCMs das Crk-Protein bekannt, welches vermutlich die Rekrutierung von Vrp1/Wip an die Fusionsstelle fördert (Kim *et al.*, 2007). Auch die stark gestörten *scar, wip* Embryonen, in denen keine Fusionen mehr stattfinden, zeichnen sich durch die Präsenz von F-Aktin-Plaques aus, die jedoch nicht in allen kontaktierenden FCMs beobachtet werden konnten, was eine verminderte Aktin-Akkumulation in diesen Mutanten andeuten könnte. Eine starke Reduktion der Plaques in den *scar, wip*-Doppelmutanten wurde bereits unter Verwendung anderer *scar/wave* bzw. *vrp1/wip* Allele in Sens *et al.* (2010) gezeigt. Dies bestätigt die Annahme, dass sowohl Wasp-, als auch Scar/Wave-gesteuerte Aktin-Polymerisation für die Bildung der Plaques wichtig ist. Die Tatsache jedoch, dass es nicht zu einem kompletten Verlust der Plaques kommt, liegt wahrscheinlich an dem noch vorhandenen Rest der maternalen Komponente von *scar/wave*. Um diese Ergebnisse zu interpretieren wurde zusammen mit den Literaturdaten ein Modell aufgestellt (Abb. 7.1). Während in FCMs Dock mit Crk kooperiert und die Zelladhäsion mit der Aktin-Polymerisation verbindet, agiert es in FCs unabhängig von Crk. Weiterhin scheint das Scar/Wave-Protein während des Fusionsvorgangs in beide Myoblastenpopulationen involviert zu sein (Sens *et al.*, 2010). Daher ist davon auszugehen, dass Dock mit Scar/Wave in beiden Zelltypen interagiert, und in FCMs zusätzlich mit Vrp1/Wip. Eine biochemische Interaktion von Scar/Wave und Dock wurde von mir im Hefe-2-Hybrid System gezeigt und zusammen mit Coimmunopräzipitationsstudien, die die Interaktion von Dock und Vrp1/Wip bestätigen in Kaipa *et al.* (2013) veröffentlicht. Da die FCMs die treibende Kraft während der Fusion sind, in welchen Aktin-Plaques formiert werden, könnte der starke Fusionsphänotyp und die verminderte Plaque-Menge in den *scar, wip* Doppelmutanten mit der Blockierung beider NPF-basierten Signalwege erklärt werden.

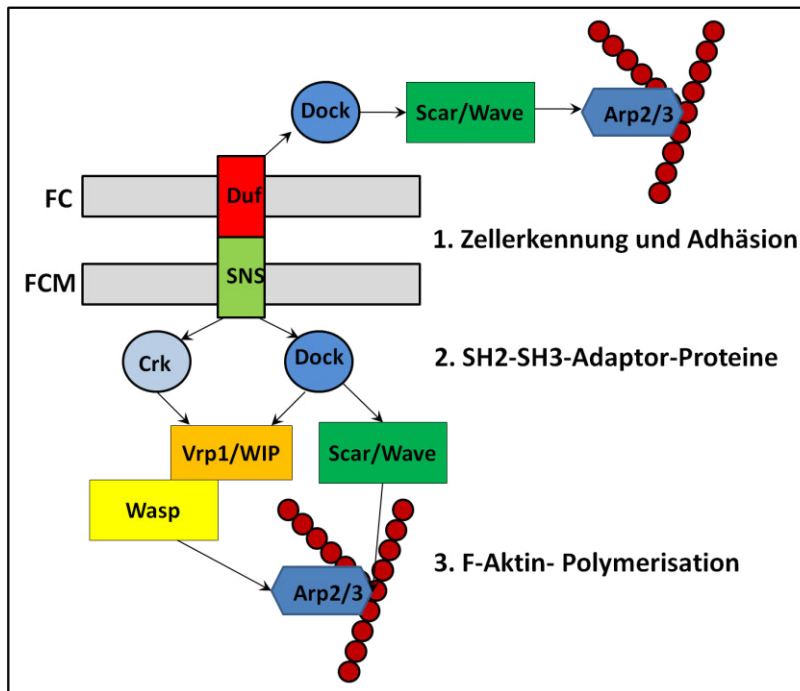


Abb. 7.1: **Modellvorstellung zur Verbindung der Zelladhäsion und der Arp2/3-basierten F-Aktin-Polymerisation über die SH2-SH3-Adaptorproteine während der Myoblastenfusion.** Die Zellerkennung und Adhäsion wird über IgSF-Proteine vermittelt. Die SH2-SH3-Adaptorproteine Dock und Crk interagieren in den FCMs mit Sns und leiten das Signal weiter an den Vrp1/Wip-Wasp-Komplex. Dieser fördert die Arp2/3-basierte Polymerisation. Parallel dazu interagiert Dock in beiden Myoblastenpopulationen mit Scar/Wave und fördert somit den zweiten Weg der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation.

Neben der Scar/Wave- und Wasp-vermittelten Aktivierung des Arp2/3-Komplexes scheinen noch zusätzliche Moleküle an diesem Vorgang beteiligt zu sein. Demzufolge wird im Weiteren das Aktinmonomer-bindende Protein Chic diskutiert.

7.2 Chic interagiert während der Myoblastenfusion mit den Regulatoren der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation

Da die spontane Aktin-Assemblierung für eukaryotische Zellen kinetisch ungünstig ist, existieren direkte Nukleatoren, wie der Arp2/3-Komplex, der die verzweigten Filamente generiert, oder auch Formin-Proteine, die die unverzweigten Filamente beispielsweise in den Filopodien bilden (Campellone und Welch, 2010; Paul und Pollard, 2009; Goode und Eck, 2007). Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes erfolgt mittels der C-terminalen VCA-Region der NPFs Scar/Wave und Wasp. Weiterhin scheint die Wasp-Vrp1/Wip Interaktion für die Stabilisierung und Rekrutierung von Wasp eine bedeutende Rolle bei diesem Prozess zu spielen (Moreau *et al.*, 2000; Chou *et al.*, 2006). Eine weitere Besonderheit dieser Proteine ist die konservierte Prolin-reiche Region, die in der Vertebraten-Muskulatur für die Komplexbildung mit Profilin zuständig ist (Reinhard *et al.* 1995; Suetsugu *et al.*, 1998).

7. DISKUSSION

Profilin bindet an G-Aktin und fördert die Aktinpolymerisation in zahlreichen Wachstums- und Transportvorgängen (Cooley *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2001; Hoppman und Miller, 2003). Die hier durchgeführten Doppelmutantenanalysen und Dosis-sensitiven Experimente mit dem *Drosophila profilin* homologen *chic*-Gen und den Komponenten der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation zeigen auf der Ebene der Myoblastenfusion eine Interaktion. In den analysierten *chic;wasp*, *chic,wip*, *chic,scar* und *chic;Arp3* Doppelmutanten kommt es zu einer Verstärkung des Fusionsphänotyps. Im Vergleich zu den Einzelmутanten sind die Fusionsstörungen in den *chic,wip* Doppelmutanten am stärksten, was auf eine starke genetische Interaktion hindeutet. Die geringen Störungen der *chic;wasp* und *chic,scar* Doppelmutanten könnten mit der noch persistierenden maternalen Komponente von *wasp* bzw. *scar* in Zusammenhang gebracht werden. Die im Anschluss durchgeführten Gendosis-Experimente geben näheren Aufschluss über die Sensitivität der Wechselbeziehung der analysierten Proteine. Der heterozygote Zustand der *wasp* und *wip* mutanten Embryonen im homozygoten *chic*-mutanten Hintergrund resultiert in einem wildtypischen Muskelmuster. Diese könnte auf ein Zusammenwirken der Proteine in einen Signalweg deuten, aber auch die noch persistierende maternale Komponente von *wasp* ist zu berücksichtigen. Die Herausnahme einer Kopie von *wasp* und *Arp3* oder entsprechend von *wip* und *scar* im homozygoten *chic*-mutanten Hintergrund erzeugt jedoch eine Verstärkung des *chic*-Phänotyps, was eine schwächere Beziehung der Proteine andeutet und die Doppelmutantenanalysen verifiziert. Auch in diesem Fall könnten die schwachen Störungen auf die maternale Bereitstellung der *wasp* bzw. *scar* mRNA zurückgeführt sein.

Um die starken Fusionsstörungen der *chic,wip* Rekombinante zu charakterisieren wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit transelektronenmikroskopische (TEM) Analysen durchgeführt (Doktorarbeit, V. Groth). Hierbei konnten hauptsächlich einkernige Myoblasten beobachtet werden. Nur in Einzelfällen kommt es zur Formierung von zweikernigen Myotuben. Zudem werden die elektronendichten Plaques noch gebildet, jedoch scheint die Porenweitung gestört zu sein. Die im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich durchgeführte Phalloidininfärbung an diesen Doppelmutanten zeigt die Präsenz der F-Aktin-Plaques. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die seltene Fusionsereignisse nicht auf die gestörte Signalweiterleitung von der Zelladhäsion an die Aktin-Polymerisation zurückzuführen sind, sondern, dass der Fusionsstopp später während des Fusionsvorgangs stattfindet, z. B. während der Expansion der Fusionsporen.

Im nächsten Abschnitt sollen die Chic-Wip, Chic-Wasp und Chic-Scar Interaktionen in die bestehenden Modellvorstellungen eingeordnet werden.

7.3 Potentielle Funktionen von Chic in der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisierung während der Myoblastenfusion

Zu den evolutionär konservierten Klassen der Aktinmonomer-bindenden Proteine gehören unter anderen Profilin/Chic, Vrp1/Wip, Wasp und Scar/Wave (Sun *et al.*, 1995). Die primäre Funktion von Profilin in eukaryotischen Zellen ist der katalytische Nukleotidaustausch an den neu depolymerisierten ADP-Aktinmonomeren gegen das ATP und daraus resultierende Förderung deren direkten Assemblierung an die bestehenden Filament-Plusenden (Pantaloni und Carlier, 1993). Seitdem bekannt ist, dass Profilin an die Prolin-reiche Domäne mehrerer Proteine, die eine direkte Filamentelongation steuern, bindet, ist es vom besonderen Forschungsinteresse die physiologische Rolle diese Bindung zu klären.

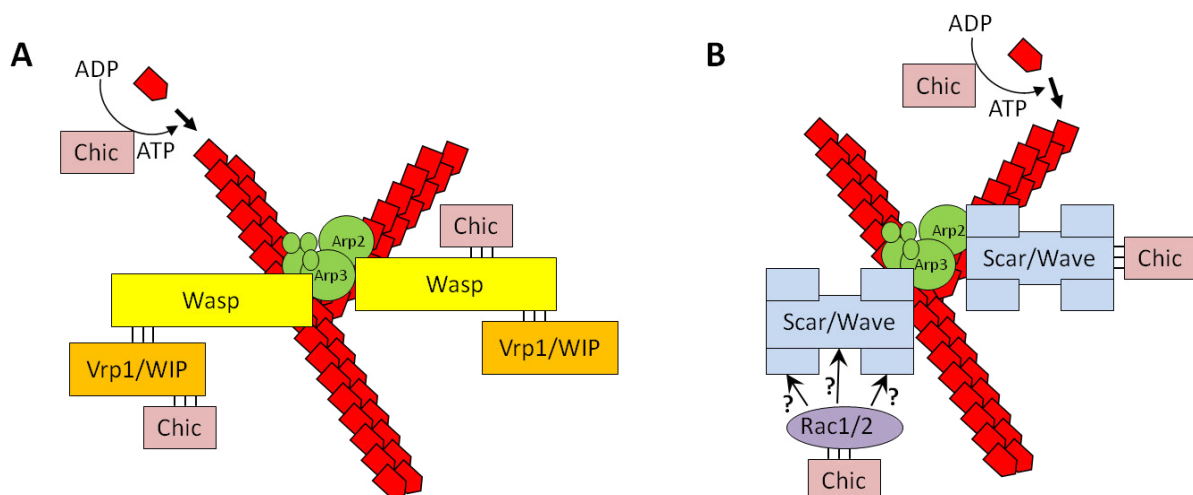
Für die *Drosophila* Myoblastenfusion konnte kürzlich anhand von Beobachtungen postuliert werden, dass Wasp und Scar/Wave-Komplexe die Bildung der Aktin-Plaques auf der Seite der FCMs vermitteln, während der Scar-Komplex alleine die Bildung der transienten F-Aktin Schicht in den FCs/wachsenden Myotuben steuert (Kim *et al.*, 2007; Massarwa *et al.*, 2007; Sens *et al.*, 2010). Doch welche Rolle könnte die Interaktion von Chic mit den Aktin-regulatorischen Komponenten während der Myoblastenfusion spielen? In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass *chic* genetisch mit den Komponenten der Arp2/3-basierten Polymerisation interagiert. Daher gilt zunächst zu klären, inwiefern diese Interaktion in der somatischen Muskulatur, wie in Vertebraten, auf einer direkten Proteinbindung beruht. Dies sollte mittels BiFC Analysen sowie mittels eines direkten Hefe-2-Hybrid Interaktionstests verifiziert werden. Geht man jedoch von einer potentiellen direkten Interaktion aus, könnte die erzielten Ergebnisse in die bereits bekannten Daten aus der Literatur integriert werden. Da es sich bei Vrp1/Wip und Wasp um FCM-spezifische Moleküle handelt, könnte eine synergetische Bindung von Chic und Vrp1/Wip an Wasp angenommen werden. Andererseits zeugen die starken Fusionsstörungen der *chic,wip* Doppelmutanten für eine starke Interaktion der beiden Proteine. Diese könnte entweder über Wasp die Aktin-Polymerisation steuern, aber auch die Wasp-unabhängige Chic-Vrp1/Wip Interaktion während der ersten Fusionsphase, bezogen auf die Literaturdaten, ist nicht auszuschließen (Berger *et al.*, 2008). Diese Daten wurden im Modell 7.2, A zusammengefasst.

Aufgrund des beobachteten schwachen Fusionsphänotyps der *chic,scar*-Doppelmutanten kann man davon ausgehen, dass die genetische Interaktion beider Gene entweder sehr schwach ist, oder auf die persistierende maternale Komponente des *scar*-Gens zurückzuführen ist. Geht man davon aus, dass das invasive Verhalten der FCMs die treibende Kraft der Myoblastenfusion ist, könnte die Abwesenheit von Chic und Scar/Wave in

7. DISKUSSION

diesem Zelltyp durch den Wasp-Vrp1/Wip-Komplex kompensiert werden. Das Fehlen dieser Proteine in den FCs führt demzufolge durch deren passives Verhalten nur zu schwachen Störungen. Weiterhin kann postuliert werden, dass Chic und Scar/Wave zwar im gleichen Signalweg agieren, die Bindung jedoch nicht auf direktem Weg erfolgt. Interessanterweise konnten Geisbrecht und Montell (2004) mittels eines Rettungsexperimentes die Migrationsstörungen der Border-Zellen in *racN17*-Mutanten durch die induzierte Expression von *chic* weitgehend wiederherstellen. Zusätzlich konnte ich eine direkte Interaktion von Chic und den beiden muskelspezifischen Rac GTPasen mittels Hefe-2-Hybrid-Tests nachweisen. Diesbezüglich sollte noch eine Verifizierung mittels BiFC-Analysen erfolgen. Dennoch lässt sich aufgrund dieser Daten eine direkte Interaktion von Chic und den redundant wirkenden Rac GTPasen vermuten. Durch die direkte Bindung der aktivierten Rac Proteine an den pentameren Scar-Komplex wird dessen Konformation verändert und die Polymerisation vorangetrieben (Koronakis *et al.*, 2011). Zusätzlich ist eine Interaktion von Chic mit einer Komponente des Scar-Komplexes nicht auszuschließen. Die beobachteten genetischen und biochemischen Interaktionen wurden zusammen mit den bereits bekannten Daten in einem Modell zusammengefasst (Abb. 7.2, B).

Aufgrund des schwachen Phänotyps der *chic;Arp3*-Doppelmutante und auch im Bezug auf den Dosisexperiment mit einer wildtypischen Kopie von *Arp3* und *wasp* im homozygoten *chic*-mutanten Hintergrund ist eine indirekte Protein-Protein-Interaktion denkbar, was mit der oben beschriebenen Modellvorstellung korreliert. Denn bei einer indirekten Interaktion werden zwei Komponente eines Multiproteinkomplexes nur durch die Existenz eines anderen zusammengehalten. Demzufolge wird angenommen, dass die Verbindung zwischen Chic und Arp2/3-Komplex durch Wasp, bzw. durch den Wasp-Vrp1/Wip-Komplex oder Scar/Wave aufrecht erhalten wird.



7. DISKUSSION

Abb. 7.2: **Modellvorstellung zur Rolle von Chic bei der Arp2/3-basierten Aktin-Polymerisation während der Myoblastenfusion.** A: Das Aktinmonomer-bindende Protein Chic interagiert am stärksten mit Vrp1/Wip. Diese Interaktion treibt entweder die Wasp-basierten Arp2/3-Aktivierung voran, oder besteht unabhängig von Wasp in der ersten temporalen Phase der Fusion. Andererseits ist eine synergetische Bindung von Vrp1/Wip und Chic an Wasp denkbar. B: Die vermutlich schwache genetische Interaktion von *chic* und *scar/wave* lässt vermuten, dass die beiden Proteine über eine weitere Komponente, wie beispielsweise Rac1 und Rac2, in einem Signalweg verknüpft sind. Wie die Rac GTPasen den pentameren Scar-Komplex aktivieren, geht aus den hier dargestellten Daten nicht deutlich hervor. Daher wäre Bindung an eine andere Einheit des pentameren Scar-Komplexes möglich. Zusätzlich ist eine direkte schwache Interaktion der beiden Proteine denkbar. Die Interaktion von Chic und dem Arp2/3-Komplex ist demnach in beiden Modellen indirekt.

Ein weiterer Chic Interaktionspartner mit einer zentralliegenden Prolin-reichen Domäne ist Ena/Vasp, der im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

7.4 Die genetische Interaktion von *chic* und *ena/Vasp* ist möglich

Zur Ena/Vasp Proteinfamilie gehören größtenteils konservierte Aktin-Regulatoren mit wichtiger Funktion in der Organisation des Aktin-Filament-Netzwerks. In Vertebraten beinhaltet diese Familie die Proteine Mena, VASP und Evl, welchen eine bedeutende Rolle bei zahlreichen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise während der Morphogenese, des axonalen Transports, der Invasion der Tumorzellen und anderer zellulärer Aktin-basierter Bewegungsabläufe zuteilwird (Reinhard *et al.*, 2001; Krause *et al.*, 2003). Als schwache Aktin-Nukleatoren fördern sie die Elongation der Filamente am schnell wachsenden Ende (Bear *et al.*, 2002). Die Struktur dieser Proteine ist ebenfalls konserviert und wird aus drei Domänen zusammengesetzt: N-terminale Ena/Vasp-Homology 1 (EVH1)-Domäne, die zentralliegende Prolin-reiche Region sowie die C-terminale EVH2-Domäne. Der EVH1-Bereich ist zuständig für die Rekrutierung der Ena/Vasp-Proteine an die Orte der Aktin-Polymerisation (Krause *et al.*, 2000), die Prolin-reiche Region beinhaltet Bindungsstellen für SH3 und WW Domänen zahlreicher Signalproteine und zusätzlich für das G-Aktin-bindende Protein Profilin (Geese *et al.*, 2000; Geese *et al.*, 2002). Schließlich vermittelt die C-terminale EVH2-Domäne die Multimerisierung und Bindung an F-Aktin (Ahern-Djamali *et al.*, 1998; Bachmann *et al.*, 1999; Carl *et al.*, 1999).

Drosophila melanogaster beinhaltet nur ein Ena/Vasp Ortholog, das erstmals mit den Aktin-basierten Prozessen während des axonalen Transports in Verbindung gebracht wurde (Krause *et al.*, 2003). Zudem wurde es in einem genetischen Screen als negativer Regulator der Abelson-Tyrosinkinase (Abl) identifiziert (Gertler *et al.*, 1990). Der völlige Verlust von *ena/Vasp* resultiert in Defekten des zentralen und peripheren Nervensystems (Gertler *et al.*, 1989). In Bezug auf die Myogenese wurden in dieser Arbeit die mutanten *ena*-Embryonen

ausgewertet. Diese zeigen wenige unfusionierte Myoblasten und Muskelwegfindungsdefekte der ventralen Muskulatur. Aufgrund dessen lässt sich eine duale Rolle von Ena/Vasp während der Muskelbildung postulieren: zum Einen während der Myoblastenfusion und zum Anderen während der Migration der Myotuben. Da die Domänenstruktur der der Wasp ähnelt und die Prolin-reiche Region für die Interaktion mit Profilin bekannt ist, war es interessant die Ena/Vasp-Chic-Interaktion auf der Ebene der Myoblastenfusion zu untersuchen. Die dazu generierten *chic,ena* Doppelmutanten deuten auf eine schwache Interaktion der Proteine hin. Die Wegfindungsstörungen der ventralen Myotuben sowie das Vorkommen unfusionierter Myoblasten scheinen im Vergleich zu der Einzelmutante deutlich verstärkt zu sein. Diese genetische Interaktion sollte jedoch zusätzlich auf biochemischer Ebene verifiziert und in Bezug auf eine direkte Interaktion getestet werden. Aufgrund von bisherigen Studien ist hypothetisch auch eine indirekte Interaktion über die Abl-Kinase möglich, die als potentielle Kinase für das zytoplasmatische FCM-spezifische Protein Blow diskutiert wird (Doktorarbeit R. Schröter, 2006; Doberstein *et al.*, 1997). Durch die Unterregulation der Abl-Kinase aufgrund der suppressorische Aktivität von Ena könnte die Phosphorylierung von Blow verhindert werden. Kürzlich wurde postuliert, dass Blow zusammen mit Wasp für die Bindung an Wip konkurriert und somit der Vorgang der Aktin-Polymerisation steuert (Jin *et al.*, 2011). Wird jedoch die Blow-Wip Bindung durch die fehlende Phosphorylierung verhindert, so wäre der stabile Vrp1/Wip-Wasp-Komplex in der Lage zusammen mit Chic die Polymerisation voranzutreiben. Ein zusätzlicher Signalweg wäre durch das Zusammenspiel von Abl und Abi möglich. Abi ist eine Komponente des pentameren Scar-Komplexes, der an der Regulation der Aktindynamik beteiligt ist. Bei der Axogenese von *Drosophila* wurde gezeigt, dass Abi und Ena der Funktion der Abl-Kinase antagonistisch wirken (Lin *et al.*, 2009). Zudem ist eine Interaktion von Chic und Abl bekannt (Wills *et al.*, 1999). Somit ist das Zusammenwirken von Chic und Ena in einem Signalweg, der die Abl-Kinase involviert vorstellbar.

Die NPFs werden durch multiple Faktoren reguliert, vor allem jedoch durch die Interaktion mit Phospholipiden und den RhoGTPasen. In Vertebraten reguliert Cdc42 die Funktion von WASP, während der Scar-Multiproteinkomplex unter der Kontrolle von Rac-GTPasen steht (Abdul-Manan *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2000; Eden *et al.*, 2002). Folgend wird die Rolle von Rac1 und Rac2 in Zusammenhang mit Chic während der Myoblastenfusion diskutiert.

7.5 Das Aktinmonomer-bindende Protein Chic interagiert auf biochemischer Ebene mit den Rac GTPasen

Aktin-Polymerisierung hängt von der Verfügbarkeit des monomeren ATP-Aktins ab. Aus zahlreichen Studien ist es bekannt, dass die Aufrechterhaltung dieses Pools durch

7. DISKUSSION

Profilin/Chic geregelt wird. Rho GTPasen, zu welchen auch die hier analysierten Racs gehören, sind molekulare Schalter, deren Aktivität stromabwärts der Membranrezeptoren benötigt wird. Im aktiven Zustand regulieren diese Proteine durch die Interaktion mit zahlreichen Effektoren zelluläre Aktin-basierte Prozesse. Inwiefern die Rac GTPasen mit Chic in Verbindung gebracht werden können, ist Bestandteil gegenwärtiger Forschung. Der Zusammenhang der beiden Faktoren konnte bereits von Fritz und VanBerkum (2002) publiziert werden. Hier führte die konstitutiv aktive Expression von Rac1 zu Störungen der axonalen Wegfindung mit Überschreitung der Mittellinie im *Drosophila* Nervensystem. Diese Defekte konnten durch den heterozygoten Verlust des Chic-Proteins abgeschwächt werden. Außerdem konnten während der Oogenese der Fruchtfliege die durch RacN17 verursachten Migrationsdefekte anhand einer induzierten Expression von Chic gerettet werden (Geisbrecht und Montell, 2004). Dieser Rettungseffekt konnte mittels *twist*-induzierter Expression von Chic im *racN17*-Hintergrund nicht für die Myoblastenfusion bestätigt werden. Dennoch könnte davon ausgegangen werden, dass Chic und Rac in einem Zusammenhang stehen können, was anhand einer bestehenden physikalischen Interaktion mittels Hefe-2-Hybrid System demonstriert wurde. In den durchgeführten Screens für die aktivierte Form der beiden Rac GTPasen konnte Chic nicht als Interaktionspartner identifiziert werden, dennoch zeigen die direkten Hefe-2-Hybrid Tests, dass Chic sowohl mit der aktivierten, als auch mit der inaktivierten Form von Rac1 und Rac2 interagiert, was auf eine aktivierungsunabhängige Interaktion der beiden Proteine hindeutet. Da die Verwendung dieses Systems jedoch nur mit Vorsicht ausgewertet werden kann, sollte die Interaktion von Rac1 und Rac2 mit dem monomerbindenden Protein anhand weiterer Protein-Interaktionsstudien verifiziert werden. Hierzu eignen sich zum Beispiel Coimmunoprecipitationsstudien, BiFC-Analysen der transfizierten *Drosophila* SL2-Zellen oder der *in vivo* Nachweis in den Fliegen. Zusätzlich könnte eine genetische Interaktion zwischen *chic* und *rac1* bzw. *rac2* anhand von Doppelmутanten überprüft werden. Die Annahme dieser Interaktion lässt postulieren, dass die Wasp- und Scar/Wave-abhängige Arp2/3-Regulation über Chic miteinander vernetzt werden können. Denn basierend auf Doppelmутantenanalysen zeigt Chic eine genetische Interaktion sowohl mit Vrp1/Wip, als auch mit Scar/Wave. Aufgrund der persistierenden maternalen Komponente der *scar*-Mutanten wird vermutlich der Phänotyp der *chic,scar*-Doppelmутanten schwächer ausgeprägt, während in *chic,wip*-Mutanten überwiegend einkernige Myoblasten beobachtet werden können (Doktorarbeit, V. Groth, 2011). In Gegensatz zu Scar ist der Wasp-Vrp1/Wip-Komplex ausschließlich in FCMs aktiv (Massarwa *et al.*, 2007). Zudem wird postuliert, dass der Scar-Signalweg für die Bildung der Fusionsporen und das Wasp-Vrp1/Wip für die Porenweitung benötigt wird (Gildor *et al.*, 2009; Sens *et al.*, 2010). Somit entsteht die

7. DISKUSSION

Hypothese, dass Rac1 und Rac2 in beiden Zelltypen und in FCMs in beiden konservierten Arp2/3-Aktivierungswegen die molekulare Schalterfunktion übernehmen (Abb. 7.3). Dies wird im nächsten Abschnitt näher erörtert.

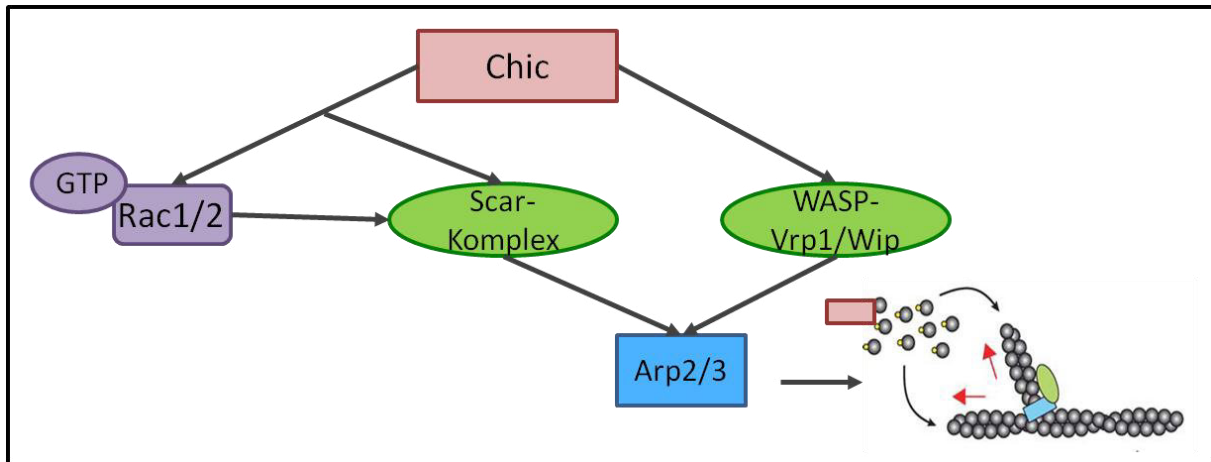


Abb. 7.3: **Modellvorstellung zur möglichen Rac1/2-Chic Interaktion während der Myoblastenfusion.** Das aktivierte GTP-gebundene Rac1/2 bindet an den Scar-Komplex und bewirkt durch die Entlassung der VCA-Domäne die Bindung und Aktivierung des Arp2/3-Komplexes. Zusätzlich ist eine Interaktion über das monomerbindende Protein Chic vorstellbar. Weiterhin könnte angenommen werden, dass Chic auch über Wasp die Aktin-Polymerisation steuert.

7.6 Die Rac GTPasen sind in die Aktin-basierten Prozesse während der Myoblastenfusion von *Drosophila* involviert

Das in dieser Arbeit analysierte Rac gehört, neben RhoA und Cdc42, zu den hochkonservierten Rho GTPasen (Heasman und Ridley, 2008; Luo *et al.*, 2011). Diese werden in einer inaktiven GDP-gebundenen Form an die Membran rekrutiert, wo der Austausch von GDP nach GTP durch GEFs gewährleistet wird. Andererseits üben GAPs eine intrinsische Aktivität aus und inaktivieren die RhoGTPasen (Appenstrom *et al.*, 1999). Es wurde beschrieben, dass die drei *Drosophila rac*-Gene im hohen Maße die Kontrolle der epithelialen Morphogenese und des axonalen Wachstums sowie die Myoblastenfusion beeinflussen (Lou *et al.*, 1994; Kaufmann *et al.*, 1998; Fanto *et al.*, 2000). Bezüglich der Myoblastenfusion konnte gezeigt werden, dass lediglich *rac1* und *rac2* benötigt werden (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002). Der Funktionsverlust von *rac* in den Doppel- und den Trippelmutanten resultiert in starken Fusionsstörungen und ist in den Doppelmutanten nicht von den der Trippelmutanten zu unterscheiden (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002; Richardson *et al.*, 2007). Zusätzlich zeichnen sich die nicht adhätierenden Myoblasten durch eine runde Morphologie aus, was auf die Funktion der Rac-Proteine während der Migration der Myoblasten hindeutet (Gildor *et al.*, 2009; Abmayr und Pavlath, 2012). Die Involvierung von Rac1 in den Fusionsprozess wurde in den letzten Jahren sehr intensiv studiert. Die Induktion

einer gewebespezifischen Expression von konstitutiv-aktivem oder dominant-negativem Rac1 führt zu einer Blockierung der Myoblastenfusion. Anhand der durchgeführten Mef2-Färbung konnte in diesen Mutanten teilweise noch Minimuskeln mit mehreren Kernen beobachtet werden, was auf wenige noch stattfindende Fusionsereignisse deutet. Da Mef2 jedoch alle Kerne der Muskelzellen markiert erweist sich diese Auswertung als schwierig. Die FC-spezifische Transkriptionsfaktoren, wie Eve, könnten daher für die Kernzählung hilfreich sein, um bestimmte Muskeln, wie DA1, zu markieren. Trotz der stark limitierten Fusion in diesen Mutanten konnte anhand der Aktin-Zytoskelett spezifischen Färbung Aktin-Akkumulation in Form von FCM-spezifischen Plaques detektiert werden. Die Plaques der wildtypischen Embryonen erscheinen signalintensiv und kompakt, während sie an der Zellkontaktstelle zu lokalisieren. Im Gegensatz dazu sind die Plaques der *racV12*-Expressionsmutanten vergrößert. Dies könnte primär mit der vermehrten Aktin-Polymerisation in Verbindung gebracht werden, was mit den Daten von Richardson *et al.* (2007) korreliert. Andererseits könnten die Plaques lediglich weniger kompakt und mehr auseinandergezogener sein, was für eine Rolle des Rac1-Proteins bei der strukturellen Organisation der Plaques sprechen würde. Werden die Plaques der *racN17*-Expressionsmutanten betrachtet, so sind diese mit der wildtypischen Situation vergleichbar, nur in einzelnen Fällen erscheinen diese verkleinert, was einerseits eine vermehrte Depolymerisation postulieren lässt, andererseits, da es sich hierbei um Momentaufnahmen handelt, könnte die vollständige Größe der Plaques noch nicht erreicht worden sein. Um diese Hypothesen näher zu analysieren, könnte die Technik der 3D-Rekonstruktion zu Nutze gemacht werden. Dabei könnten anhand der Volumenbestimmung und einer statistischen Auswertung konkretere Aussagen bezüglich der Plaque-Größe gemacht werden. Eine weitere interessante Frage ist, inwiefern das Rac1-Protein in den hier beobachteten Aktin-Plaques lokalisiert. Dieser wird im nächsten Abschnitt nachgegangen.

7.7 Die neu Rac1V12-Linie, die mit Hilfe der Φ -Integrase auf das dritte Chromosom integriert wurde, weist, im Vergleich zu den von Luo *et al.* (1994) generierten Linien, einen schwächeren Phänotyp auf

Um die Rolle der beiden muskelspezifischen Racs bei der Myoblastenfusion im Detail zu verstehen, ist es notwendig deren Lokalisation während der Embryonalentwicklung zu untersuchen. Es ist bekannt, dass das *rac1*-Transkript ab dem Stadium 11 im somatischen Mesoderm angereichert ist (Lou *et al.*, 2011). In dieser Zeit (zwischen Stadium 12 und 15) findet die zweiphasige Fusion der Myoblasten statt. In Bezug auf die Proteinlokalisierung konnte unter Verwendung des Rac1-spezifischen Antikörpers in Embryonen sowie mittels anti-aktiv-rac1-GFP in primären Myoblastenzellen eine deutliche Akkumulation an der

Kontaktstelle der FCMs beobachtet werden (Haralalka *et al.*, 2011, Duan *et al.*, 2012). In unserem Labor jedoch konnte das endogene Rac1-Protein unter Verwendung des Rac1-spezifischen Antikörpers nicht in den Aktin-Plaques nachgewiesen werden. Dagegen war eine gleichmäßige Verteilung um die Myoblastenmembran zu beobachten (persönliche Mitteilung von S. Önel). Die daraus resultierende wahrscheinliche Lokalisation in den F-Aktin-Plaques bietet eine Plattform für weitere analytische Angriffspunkte. Eine weitere Fragestellung ist, inwiefern die beschriebene Proteinlokalisierung am Zellkontakt in den *N17* und *V12* Expressionsmutanten gestört sein könnte. Phalloidin-Färbungen an den von Luo *et al.* (1994) generierten Fliegenlinien zeigen, dass trotz des starken Fusionsphänotyps die Plaque-Bildung noch stattfindet. Da die gleichzeitige Bestimmung des aktiven bzw. inaktiven Rac1 aufgrund des nicht vorhandenen Tags nicht möglich war, wurde versucht im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von zielgerichteten Mutagenese den bekannten Aminosäureaustausch einzufügen und in die modifizierte Gateway-Vektoren, die mit einem Tag versehen waren, zu klonieren. Weiterhin war es wichtig, parallel zu Rac1 auch das redundant wirkende mutagenisierte Rac2 in die Vektoren einzubringen, da dessen Funktion während der Myogenese bislang noch wenig erforscht ist. Dies erwies sich als schwierig, da die transgenen Fliegenlinien, die das mutagenisierte Rac1 oder Rac2 mit dem C-terminalen Tags ins Genom aufgenommen haben, eine wildtypische Muskulatur haben. Auch die Verwendung von unterschiedlichen Tags (10-fach Myc, mCherry oder GFP) erzeugte nicht den erwarteten Fusionsphänotyp. Da das Protein mit ca. 21 kDa relativ klein ist, könnte sich der eingefügte Tag störend auf die Faltung auswirken, deshalb könnte möglicherweise die Einfügung eines N-terminalen Tags hilfreich sein. Andererseits wurde zur Kontrolle des Konstrukts das *rac1V12-rfa* ohne Tag in die Fliegen eingebracht. Diese zeigen, bei einer Mesoderm-spezifischen induzierten Expression, einen variablen Phänotyp, der in Vergleich zu den vorhandenen *rac1V12*-Mutanten deutlich schwächer ist. Da die von Luo *et al.* (1994) generierte Linien nicht charakterisiert sind, kann der abweichende Phänotyp einerseits durch die verschiedene genomische Integrationsorte, andererseits durch eine mögliche Mehrfachinsertion der vorhandenen *racV12*-Linie erklärt werden. Abschließend kann postuliert werden, dass Rac1, trotz des beobachteten schwächer ausgeprägten Phänotyps eine bedeutende Funktion bei der Myoblastenfusion einnimmt. Zudem konnte somit die Funktionalität dieses Konstrukts nachgewiesen und für den anschließenden Hefe-2-Hybrid Screen verwendet werden. Weiterhin, um diese Analyse zu vervollständigen, sollte die aktivierte und dominant-negative Form von *rac2* ebenfalls ohne den Tag in *Drosophila* Embryonen eingebracht werden. Zusätzlich wäre die Verwendung des N-terminalen Tags möglich. So könnte gleichzeitig die Lokalisation von aktiven bzw. inaktivem Rac1 und Rac2 *in vivo* verfolgt werden um beispielsweise anhand einer Kolo-kalisation gemeinsames Agieren

sowie redundante Funktionen auf der Ebene der Myoblastenfusion zu bestätigen. Ferner wäre, durch das Einkreuzen der getagten *N17* oder *V12* Linien in den mutanten Hintergrund von anderen Aktin-regulatorischer Mutanten, wie beispielsweise *scar* oder *kette*, eine gestörte Lokalisation der aktiven bzw. inaktiven Racs sichtbar.

Über die Funktion von Rac2 während der Myoblastenfusion ist bisher nur wenig bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass *rac2*-Einzelmutanten beinahe eine wildtypische Muskulatur aufweisen mit nur wenigen isolierten unfusionierten Myoblasten. Bei den *rac1*-Einzelmutanten ist sogar eine komplett abgeschlossene Myoblastenfusion zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu führt eine Kombination aus *rac2* und *rac1* Mutationen zu einem starken Fusionsphänotyp mit nur wenigen Fusionsereignissen (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002) sowie wildtypischer Plaque-Größe, wie in dieser Arbeit beobachtet wurde. Es ist daher anzunehmen, dass beide Proteine während des Fusionsvorgangs redundant wirken. Daher war es wichtig den Hefe-2-Hybrid Screen für beide Rac GTPasen durchzuführen um einerseits die Proteine in eine bekannte Signalkaskade einordnen zu können, andererseits potentielle Parallelen aufzuzeigen. Leider konnten in den durchgeführten Screens weder gleiche Kandidaten identifiziert werden, noch Interaktionen mit bekannten Aktin-Regulatoren aufgedeckt werden. Dies könnte damit begründet werden, dass die beiden Moleküle dennoch redundant wirken könnten, aber unterschiedlich aktiviert bzw. inaktiviert werden. Kürzlich wurde das nicht-konventionelle GEF, Mbc, als ein potentielles FCM-spezifisches Rac1-Aktivator vorgestellt (Haralalka *et al.*, 2011). Daher war ein weiteres Ziel des Screens, da eine aktivierte Form des Proteins verwendet wurde, einen GAP zu identifizieren, welcher die Inaktivierung steuern könnte. Dies war ebenfalls nicht möglich. Das Hefe-2-Hybrid System weist einige Schwächen auf, sodass eine bestehende Proteininteraktion auch nicht identifiziert werden könnte. Da die Interaktion der Proteine im Zellkern stattfinden muss, wo die Transkription abläuft, ist eine andere Faltung, im Vergleich zu der im natürlichen Milieu vorkommenden, möglich, was eine Interaktion verhindern könnte. Zusätzlich können die posttranslationalen Modifikationen der Proteine in Hefezellen stark von denen der Eukaryoten abweichen. Bezüglich der identifizierten Kandidaten ist noch anzumerken, dass zahlreiche potentielle Interaktionspartner aufgrund der zellulären Lokalisation nicht tatsächlich mit den Rac GTPasen interagieren und daher ausgeschlossen werden können. Einige interessante Kandidaten werden im folgenden Abschnitt bezüglich deren Rolle während der Myoblastenfusion diskutiert. Zudem soll die Funktion der bereits bekannten GAPs, die zusammen mit Mbc die Regulation der Rac GTPasen steuern könnten, erörtert werden.

7.8 Eine potentielle Funktion der im Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten putativen Interaktionspartnern für die Myoblastenfusion

In dem durchgeführten Hefe-2-Hybrid Screen für Rac1V12 wurde Csk als ein putativer Interaktionspartner für Rac1 identifiziert. Aufgrund der direkten Interaktionstests interagiert Csk sowohl mit der aktivierten, als auch mit der dominant negativen Form von Rac1, was schlussfolgern lässt, dass diese Bindung nicht auf der Aktivierung von Rac1 basiert. Csk fungiert als ein wichtiger negativer Regulator der Src-Familie-Proteine, denen eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Zelladhäsion und Zellinvasion während der Onkogenese zugewiesen wird. Die Inaktivierung erfolgt dabei durch die Phosphorylierung der Src-Kinasen. In einer kürzlich publizierten Studie konnte im *Drosophila* Flügelepithelium gezeigt werden, dass die Abl-Tyrosinkinase *in vivo* stromabwärts von den Src-Kinasen agiert (Singh *et al.*, 2010a). Im Gegensatz zu den Säugern ist Abl in *Drosophila* primär zytoplasmatisch lokalisiert (Taagepera *et al.*, 1998). Zudem ist bekannt, dass es im Nervensystem und in den epithelialen Zellen benötigt wird, wo es durch die vorhandene konservierte Aktin-Interaktionsdomäne die Stabilität der Adherens Junctions und die Aktinorganisation reguliert (Grevengoed *et al.*, 2001; Fox und Peifer, 2007). Singh *et al.* (2010a) zeigten gleichzeitig, dass die aktivierte Abl-Kinase durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die Aktivität der Src-Kinase erhöht. Weiter in der Signalkaskade wird die kleine GTPase Rac1 aktiviert, was ihrerseits zahlreiche Signalwege reguliert. Basierend auf diesen Studien und auf der im Hefe-2-Hybrid Screen beobachteten Interaktion kann postuliert werden, dass Rac1 in einem Rückkopplungsmechanismus die Aktivität von Csk steuern könnte und somit Einfluss auf dessen Abl-Kinase-basierte Aktivierung nehmen könnte. Dieses Zusammenwirken sollte mittels genetischer und biochemischer Interaktionsstudien analysiert werden. Die potentielle Involvierung von Csk in die Muskelentwicklung wird mittels Mesoderm-spezifischer Transkriptlokalisation in den frühen embryonalen Stadien gestützt. In einem genetischen Screen konnte *fax* als Interaktionspartner für *abl* identifiziert werden (Gertler *et al.*, 1989, Hill *et al.*, 1995). Da auch Fax in dem hier durchgeführten Screen als putativer Interaktionspartner für Rac1 entdeckt wurde, könnte es in den hier beschriebenen Signalweg integriert werden. Da sich jedoch das *fax*-Transkript während der Embryogenese hauptsächlich auf das Nervensystem beschränkt und die analysierten mutanten Embryonen keinen Muskel-spezifischen Fusionsphänotyp aufweisen, wird davon ausgegangen, dass diese Interaktion für die Myoblastenfusion nicht relevant ist. Dies wird durch eine Dosis-sensitive Interaktion zwischen *abl*, *fax*, *ena/Vasp* und dem RacGEF *trio* im zentralen Nervensystem der Fliege unterstützt (Liebl *et al.*, 2000).

7. DISKUSSION

Des Weiteren wurde in dem Hefe-2-Hybrid Screen für Rac1V12 das Aktin-bindende Protein WupA identifiziert, dem eine Rolle bei der Sarkomer-Kontraktion in den Skelett- und Herzmuskeln zugewiesen wird. Zudem führt die Mutation des Gens in *Drosophila* zur Degeneration der adulten indirekten Flugmuskulatur (Prado *et al.*, 1995). Aufgrund der Mesoderm-spezifischen Expression in den späten embryonalen Entwicklungsstadien kann eine Funktion des Gens während der Myoblastenfusion postuliert werden. Da jedoch der verfügbare Antikörper in den Embryonen nicht funktional zu sein scheint, bedarf es weiterer Analysen um die Funktionalität von WupA näher zu charakterisieren. Interessanterweise besitzt WupA eine konservierte Kalzium-bindende Domäne. Da die Immunologische Synapse und FuRMAS viele gemeinsame Eigenschaften haben, wurde kürzlich das Kalzium-bindende Protein *Drosophila* Swiprosin-1 (DSwip-1) identifiziert, das an der Zellkontaktstelle in FCMs exprimiert wird (Hornbruch-Freitag *et al.*, 2011). Basierend auf dessen Lokalisation in Aktin-Plaques und dessen Fehllokalisation in Aktin-Mutanten wurde in dieser Studie postuliert, dass DSwip-1 eines der Moleküle ist, das in einer Kalzium-abhängigen Weise die Exozytose der elektronendichten Vesikel des Präfusionskomplexes reguliert. Demzufolge sollte auch WupA bezüglich dessen Rolle während der Myoblastenfusion untersucht werden. Dazu sollte zunächst die Proteinexpression einerseits mittels eines neu hergestellten Antikörpers, andererseits mittels Generierung einer transgenen WupA-GFP-Linie ermittelt werden. Folgend sollte das endogene mit dem GFP-Expressionsmuster verglichen werden. Im Fall einer Expression an der Zellkontaktstelle könnte eine Doppelmutante mit *DSwip-1* hergestellt werden um zu ermitteln, inwiefern die beiden Kalzium-bindende Proteine genetisch miteinander interagieren können, und inwiefern eine funktionelle Redundanz bestehen könnte.

In einem zusätzlich durchgeführten Screen für Rac2V12 wurden ebenfalls zahlreiche Interaktionspartnern identifiziert, deren Analyse noch aussteht. Aufgrund der Literaturdaten scheinen Bap55 und Mys interessante Kandidaten zu sein. Bap55 ist ein Chromatin-Umstrukturierungsfaktor, der Zell-kernspezifisch lokalisiert ist (Papoulas *et al.*, 1998). Da es während des Fusionsvorgangs in *Drosophila* zur Umprogrammierung des Genoms der integrierten FCMs kommt, ist die Beteiligung von Bap55 während der Myoblastenfusion nicht auszuschließen. Bezüglich des β -Integrins Mys konnte in Vertebraten gezeigt werden, dass es sich bei Integrinen um klassische bidirektionale Membranrezeptoren handelt, die in dem aktiven Zustand die Erkennung der Myoblasten steuern (Delon und Brown, 2007). In *Drosophila* *mys* mutanten Embryonen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Myotuben multinukleär sind und eine abgerundete Morphologie aufweisen (Wright, 1960). Dies deutet darauf hin, dass die Beteiligung des Mys-Proteins an der Myoblastenfusion unwahrscheinlich

ist, und dass dieses Protein lediglich bei der Anheftung der Muskeln an die Epidermis eine Funktion hat.

7.9 Von den phänotypisch analysierten GAPs scheint Tum während der Myogenese eine Rolle zu spielen

Die Aktivität von Signalwegen, die in der Bildung der embryonalen Muskulatur resultieren, wird stark reguliert. Dabei wird die Funktionalität der Rho GTPase Rac von den positiven und negativen Regulatoren beeinflusst. Die Inaktivierung bedingt eine sehr niedrige GTPase Aktivität und wird von GAPs bewerkstelligt. Zahlreiche *Drosophila* GAPs wurden in unterschiedlichen Geweben charakterisiert, (Sotillos und Campuzano, 2000; Agnel *et al.*, 1992; Guichard *et al.*, 1997; Bruinsma *et al.*, 2007; Lundström *et al.*, 2004) doch über deren Involvement in die Myogenese ist bisher noch nichts bekannt. Hier konnte ich zum ersten Mal zeigen, dass das *Drosophila* MgcRacGap orthologe Protein Tum bei der Bildung der somatischen embryonalen Muskulatur eine Rolle spielen könnte. Diese Annahme wurde anhand des beobachteten Muskelphänotyps abgeleitet. Die GAP-Domäne von Tum ähnelt dem Säuger-GAP, N-chimerin, welcher für die Aktivität der RacGTPase verantwortlich ist (Ahmed *et al.*, 1994). Daher ist es anzunehmen, dass Tum gezielt an die drei *Drosophila* Racs (Rac1, Rac2 und Mtl) binden kann. Die Wirkung als negativer Regulator von Rac1 wurde bereits bei der Entwicklung der Flügel-Imaginalscheibe gezeigt (Sotillos und Campuzano, 2000). Zwei Jahre später bestätigen genetische Experimente, dass Tum während der Zytokinese der larvalen Neuroblasten die Funktion von Rac1 inhibiert und dessen Inaktivierung steuert (D'Avino *et al.*, 2004). Inwiefern Tum während der Myoblastenfusion eine Rac1/2-inhibierende Funktion einnimmt, muss noch weiter analysiert werden. Dabei kann die Protein-Interaktion mittels zur Verfügung stehender biochemischer Techniken, wie beispielsweise Coimmunopräzipitationsstudien und BiFC, bestätigt werden. Zudem kann anhand von Doppelmutantenanalysen und gewebespezifischen Rettungsversuchen von *tum*-Mutanten festgestellt werden, inwiefern die Expression auf eine Myoblastentyp-Spezifität beruht. Zusätzlich wäre interessant, inwiefern es zu einer Abschwächung des *rac1V12*-Fusionsphänotyps durch eine zusätzliche Herausnahme von *tum* kommt. Insgesamt kann postuliert werden, dass die Aktivität der GAP-Proteine zur Unterdrückung der Rac GTPasen erforderlich ist, um den Fusionsprozess voranzutreiben und die Integration der FCM in die FCs/wachsende Myotuben zu gewährleisten.

7.10 Die Aktivierung des Scar-Komplexes durch die GTPasen Rac1 und Rac2 wird vermutlich über die Interaktion mit Sra1 und/oder Kette reguliert

Die Bildung der FCM-spezifischen Aktin-Plaques wird hauptsächlich durch die NPF-Einwirkung von Scar/Wave und Wasp auf den Arp2/3-Komplex gewährleistet. Das Scar/Wave-Protein scheint dabei in beiden Zelltypen benötigt zu werden (Sens *et al.*, 2010). Zusammen mit anderen Komponenten wird ein pentamerer Scar-Komplex geformt, dessen Aktivierung von Rac1 gesteuert wird. Während der Myoblastenfusion wird dies durch die falsche Lokalisation von Scar/Wave in den *rac1, rac2, mtl*-Tripplemutanten bestätigt (Gildor *et al.*, 2009). Die Bindung der aktivierten Rac1-GTPase führt zur Freisetzung der VCA-Domäne, wodurch die Aktivität des Komplexes gegeben ist (Ismail *et al.*, 2009; Lebensohn und Kirschner, 2009). Inwiefern es sich hierbei um eine direkte Bindung an das Scar/Wave-Protein handelt wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die mittels Hefe-2-Hybrid System durchgeführten direkten Interaktionstest deuten zunächst darauf hin, dass Scar/Wave nicht mit der aktivierten Form von Rac1 interagiert. Dies lässt die Präsenz eines Linker-Moleküls vermuten. Miki *et al.* (2000) postulierten IRSp53, ein Substrat für den Insulinrezeptor, welcher in Cos7-Zellen sowohl an das aktivierte Rac1, als auch an den Scar/Wave bindet um einen trimolekularen Komplex zu bilden. In diesem Zusammenhang wurde das *Drosophila* homologe CG32082 bezüglich dessen Funktion während der Myoblastenfusion analysiert. Da weder *in situ*-Hybridisierungen eine Mesoderm-spezifische Lokalisation zeigen, noch das exprimierte RNAi-Konstrukt einen Fusionsphänotyp aufweist, deuten diese Ergebnisse entweder auf eine nicht funktionelle Rolle von CG32082, oder eine Redundanzwirkung während der Muskelbildung hin. Interessanterweise konnte mittels einer BiFC-Analyse in *Drosophila* SL2-Zellen eine Interaktion von Scar mit Rac1 bzw. Rac2 nachgewiesen werden, was einerseits auf die Schwächen des durchgeführten Interaktionstests in Hefezellen hinweist. Denn aufgrund der erzwungenen Translokation in den Zellkern kann sich die Faltung der Proteine verändern und die mögliche Interaktion verhindert werden. Auch das Vorhandensein von posttranslationalen Modifikationen spielt hierbei eine Rolle. Andererseits, betrachtet man das BiFC-Verfahren, so kann es auch zu einer Fluoreszenzkomplementierung durch das Zusammenlagern der beiden YFP-Fragmente kommen, wenn die Proteine nicht direkt miteinander interagieren, sondern sich in unmittelbarer Nähe befinden, wie das bei einem Proteinkomplex der Fall ist. Auch die Möglichkeit einer zufälligen Lokalisation der Proteine im gleichen Kompartiment ist nicht auszuschließen. Folglich resultiert daraus, dass Rac1 bzw. Rac2 nicht direkt mit Scar/Wave interagiert, jedoch mit einem oder mehreren Komponenten des Scar-Komplexes.

Kette ist ein Bestandteil des Scar-Komplexes, dem eine regulierende Funktion bezüglich der Lokalisation und Stabilisation von Scar/Wave zugewiesen wird (Gildor *et al.*, 2009). Die mutanten Embryonen zeigen einen starken Fusionsphänotyp, der mit einem Stopp des Fusionsereignisses während der Bildung der elektronendichten Plaques korreliert (Schröter *et al.*, 2004). Durch eine Zelltyp-spezifische Rettung mit der induzierten Expression des UAS-Kette-Konstruktes konnte die Notwendigkeit des Proteins in beiden Zelltypen nachgewiesen werden (Masterarbeit J. Hamp, 2012). In dieser Arbeit konnte zusätzlich ein Bezug zwischen Rac GTPasen und Kette hergestellt werden. In den durchgeführten Hefe-2-Hybrid Screens mit der aktivierten Form von Rac1 bzw. Rac2 wurde Kette zunächst nicht als putativer Interaktionspartner identifiziert, jedoch weisen die zusätzlich durchgeführten direkten Interaktionsstudien in Hefezellen auf eine direkte Interaktion der Proteine hin. Diese Interaktion sollte jedoch mittels eines BiFC-Assays in *Drosophila* SL2-Zellen verifiziert werden. Ein Rettungsversuch von *rac1,rac2*-Doppelmutanten mit UAS-Kette steht noch aus. Sollte sich dieses Zusammenwirken jedoch bestätigen, könnte angenommen werden, dass die Rac1/2-abhängige Aktivierung des Scar-Komplexes über Kette laufen könnte (Abb. 7.4). Weiterhin wurde das Säuger-homologe Protein Nap1 als Interaktionspartner für Nck (*Drosophila* homologe Dock) identifiziert (Kitamura *et al.*, 1996). In *Drosophila* interagiert Dock auf biochemischer und genetischer Ebene mit Scar/Wave (Kaipa *et al.*, 2013). Demzufolge kann postuliert werden, dass die Aktivierung des Scar-Komplexes einerseits durch die Bindung von Kette an das aktivierte Rac1 und Dock erfolgt, andererseits ist eine Rac1-unabhängige Aktivierung durch Dock denkbar. Interessant ist auch die postulierte antagonistische Wirkung von Kette und Wasp (Bogdan und Klämbt, 2003; Schäfer *et al.*, 2007), was vermuten lässt, dass die Scar/Wave- und Wasp-basierte Arp2/3-Aktivierungswege nicht völlig voneinander getrennt sind, sondern sich gegenseitig beeinflussen können.

Eine weitere integrale Komponente des Scar-Komplexes ist Sra1, was mit Kette koexprimiert wird und als Protein *in vivo* eine Interaktion mit Kette aufweist (Bogdan *et al.*, 2004). Studien in Vertebratenzellen zeigen, dass die Rac1-vermittelte Aktivierung des Scar-Komplexes auf dessen Bindung an Sra1 beruht (Eden *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1998; Miki *et al.*, 2000). Dabei konnte der Interaktionsbereich auf die ersten N-terminalen 401 Aminosäuren beschränkt werden (Kobayashi *et al.*, 1998). Die essentielle Rolle von Sra1 in *Drosophila* konnte bisher nur bei der Entwicklung des Nervensystems und der Borstenmorphogenese gezeigt werden (Bogdan *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit durchgeführte Rettung der *rac1,rac2*-Doppelmutanten mittels Mesoderm-spezifischer Expression von UAS-Sra1 deutet auf eine potentielle Funktion des Sra1-Proteins während der Muskelbildung hin. In diesem Fall konnte der starke Fusionsphänotyp der Doppelmutanten partiell gerettet werden. Somit

7. DISKUSSION

kann postuliert werden, dass das GTP-gebundene Rac1 bzw. Rac2 über die Interaktion mit Sra1 die Scar-Komplex-basierte Aktin-Polymerisierung steuert (Abb. 7.4). In diesem Zusammenhang wäre es noch interessant Zelltyp-spezifische Rettungen durchzuführen um zu analysieren, inwiefern diese potentielle Interaktion nur auf einen Myoblastentyp beschränkt ist.

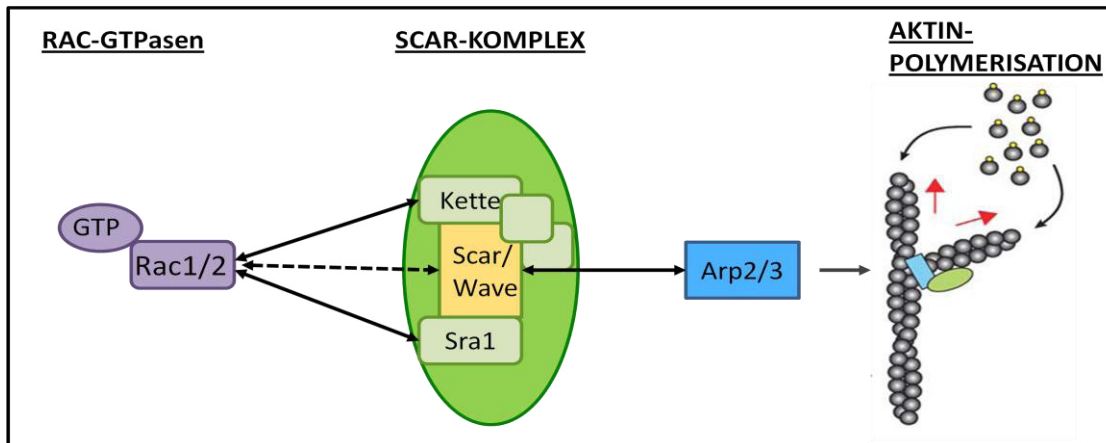


Abb. 7.4: **Der Scar/Wave-basierte Signalweg beruht vermutlich auf dessen Rac1/2-vermittelten Aktivierung über die Komponente Sra1 und/oder Kette.** Basierend auf den hier durchgeführten Interaktionsstudien wird der pentamere Scar-Komplex durch die direkte Interaktion (gekennzeichnet durch Doppelpfeile) von GTP-geladenen Rac1- und Rac2-Proteine und den Komplex-Komponenten Sra1 und/oder Kette aktiviert. Aufgrund der genetischen und biochemischen Studien ist eine indirekte Interaktion (gekennzeichnet durch den gestrichelten Doppelpfeil) mit dem Scar/Wave-Protein anzunehmen.

Neben der Aktin-Polymerisation wurde im Rahmen dieser Arbeit der durch den Membranzusammenbruch eingeleitete Depolymerisationsprozess analysiert. Dabei wurde zum Einen die Rac-basierte Regulation der Cofilin/Tsr-Aktivierung untersucht, zum Anderen auf den Ko-Faktor Flr eingegangen. Dies wird in den nächsten Abschnitten diskutiert.

7.11 Die Rac1-gesteuerte Regulation der Tsr-Phosphorylierung kann für die *Drosophila* Myoblastenfusion nicht verifiziert werden

Zellkulturexperimente an Vertebratenzellen haben gezeigt, dass die dynamischen Aktin-Regulatoren Rac1 und Cofilin während der Bildung der Lamellipodien eine bedeutende Rolle spielen (Bamburg 1999). Während der Migration der Border-Zellen in *Drosophila* wird das Zusammenwirken der Proteine bestätigt (Zhang *et al.*, 2011). Dabei signalisiert Rac1 an die Pak-Kinase, welche über die Phosphorylierung die Lim-Kinase aktiviert, die wiederum inaktivierend auf die depolymerisierende Aktivität von Cofilin wirkt. In dieser Studie konnte eine Verbesserung der Migrationsdefekte der Border-Zellen in der *racN17*-Expressionsmutante mittels einer phospho-mimetischen Mutante, *tsrS3E*, beobachtet

werden. Das hier durchgeführte analoge Experiment auf Ebene der Myoblastenfusion erzeugte keine Rettung des *racN17*-Phänotyps, was das Zusammenwirken der Proteine in einem Signalweg zunächst unwahrscheinlich macht. In einer kürzlich publizierten Studie wurde die Interaktion zwischen Rac1 und DPak3 während der Myoblastenfusion beschrieben und diese Interaktion als ein paralleler Weg zu der Wasp- und Scar/Wave-vermittelten Aktin-Polymerisation vorgeschlagen (Duan *et al.*, 2012). Während DPak3 in Embryonen in den F-Aktin-Plaques lokalisiert, kommt es in den *rac1, rac2*-Doppelmutanten zur entsprechenden Lokalisationsstörung. Demzufolge wurde postuliert, dass Rac1 die zelluläre Lokalisation von DPak3 vermittelt. Zudem wurde angenommen, dass dieser Signalweg, entgegen den früheren Studien, während der Myoblastenfusion die Aktin-Depolymerisierung nicht unterdrückt, da *dpak3* weder mit *limk* noch mit *tsr* genetisch interagiert (Duan *et al.*, 2012). Diese Untersuchungen korrelieren mit der nicht erfolgten Rettung der *racN17*-Mutanten. Andererseits reguliert Rac1 auch den Scar/Wave-abhängigen Weg der Aktin-Polymerisation. Wird dieser in den *racN17*-Expressionsmutanten ebenfalls gestört, so kann der Fusionsphänotyp nicht durch die alleinige ektopische Expression der dominant negativen Form von Tsr gerettet werden.

7.12 Der depolymerisierungsfördernde Kofaktor Flr wird Mesoderm-spezifisch transkribiert und weist vermutlich eine genetische Interaktion mit Tsr auf

Das Gleichgewicht zwischen Aktin-Polymerisation und Depolymerisation determiniert den lokalen Fusionsprozess und somit auch die Struktur, Größe und Funktion der Aktin-Akkumulationen auf beiden Seiten der fusionierenden Myoblasten. Richardson *et al.* (2007) haben die Dynamik der Aktin-Plaques in wildtypischen Embryonen anhand der beobachteten Größenvarianz und zeitlichen Abfolge deren Bildung und Auflösung demonstriert. Zudem wird postuliert, dass in einzelnen Mutanten, die in die Scar/Wave-abhängige Arp2/3-Polymerisation involviert sind, wie beispielsweise *rac*, *mbc*, *kette* oder *scar*, die Auflösung der Plaques gestört ist, was mit der fehlenden Depolymerisierung erklärbar sei. Die letale Mutation des evolutionär konservierten Depolymerisationsfaktors *tsr* verursacht in *Drosophila* zytokinetische Defekte während der Morphogenese der Rhabdomere sowie Migrationsstörungen der Border-Zellen, was ihn als einen wichtigen Regulator der Aktin-basierten Zellbewegung darstellen lässt (Chen *et al.*, 2001; Pham *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Während der Myoblastenfusion bewirken die Nullmutationen des Gens keinen Phänotyp, was einerseits mit der Persistenz der maternalen Komponente bis zum 14 Entwicklungsstadium zu begründen ist, andererseits könnte eine funktionelle Redundanz des Proteins angenommen werden. Bereits in frühen Untersuchungen konnte in Hefezellen, Pflanzen und Tieren eine genetische und biochemische Interaktion zwischen Cofilin und

7. DISKUSSION

Aip1, *Drosophila* Flr, nachgewiesen werden (Okada *et al.*, 1999, Ono *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2006). Im Jahr 2007 konnte auch eine Aktin-disassemblierende Rolle von Flr in pupalen Epidermiszellen gezeigt werden (Ren *et al.*, 2007). Während der Borstenmorphogenese interagiert *flr* genetisch mit *tsr* und zeigt einen *tsr*-ähnlichen anormalen Haarphänotyp. Bezüglich der Funktion von Flr während der Muskelentwicklung konnte in dieser Arbeit zunächst ein Nachweis der Transkriptlokalisation im Mesoderm ab Stadium 13 erbracht werden. Auch die induzierte Expression des GFP-markierten Flr in der somatischen embryonalen Muskulatur detektierte das Protein ab Stadium 15. Dennoch zeigen die untersuchten *flr*-Nullmutanten keine Fusionsstörungen, was zum Einen auf die bestehende maternale Komponente zurückzuführen sein könnte, zum Anderen kann eine Redundanz mit anderen depolymerisierenden Proteinen nicht ausgeschlossen werden. Die maternale Komponente betreffend, sollte eine *in situ*-Hybridisierung an den *flr*-nullmutanten bzw. an den *flr*-defizienten Embryonen durchgeführt werden um deren Persistenz zu ermitteln. Des Weiteren könnte durch die Herstellung von Keimbahnklonen die maternale Komponente entfernt werden. Interessanterweise zeigen die generierten *tsr;flr*-Doppelmutanten zwar keine Fusionsstörungen, zeichnen sich jedoch durch Lücken in der somatischen Muskulatur aus. Diese potentielle genetische Interaktion könnte auf das Zusammenwirken der Proteine hindeuten. Die Interaktion sollte auf der biochemischen Ebene, beispielsweise unter Verwendung der BiFC-Analyse in *Drosophila* SL2-Zellen und/oder Embryonen verifiziert werden.

Die Expression von *flr* in anderen untersuchten larvalen und adulten Geweben verdeutlicht dessen bedeutende Rolle während der Entwicklung der Fruchtfliege. Interessant ist die Lokalisation des Transkripts und des Proteins während der Oogenese. Bei diesem Prozess werden die von den Stammzellen produzierte Oogonien in Folge der festgelegten Zellteilung in 16 Zellen geteilt, die über die Zytoplasmabrücken miteinander verbunden bleiben. Nur eine dieser Zellen entwickelt sich zur Oozyte, die anderen werden zu Nährzellen. Dieser Zellverband wird von einem somatischen Folikelepithelium umgeben. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die *flr*-mRNA nur in dem Zytoplasma der Nährzellen detektierbar ist, während die Oozyte signalfrei bleibt. Wird jedoch die Proteinlokalisation des exprimierten Flare-GFP analysiert, wird diese am stärksten in der Oozyte und etwas schwächer in den Nährzellen detektiert. Dies ist damit zu begründen, dass die Translation der mRNA in der Oozyte zeitlich früher ablaufen muss, sodass in diesem Stadium bereits das Protein vorhanden ist. Andererseits handelt es sich hierbei um eine induzierte Expression des Konstrukts, was eine erhöhte Synthese des Proteins zur Folge hat. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Präsenz der maternalen Komponente.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass Flr durchaus eine Rolle während der Entwicklung der embryonalen Muskulatur und auch anderer larvaler und adulter Gewebe spielen könnte. Zusammen mit Tsr könnte es die Auflösung der Aktin-Plaques fördern und deren Dynamik begünstigen. Inwiefern noch andere Aktin-depolymerisierende Moleküle in diesem Vorgang involviert sein könnten, wird im nächsten Abschnitt erörtert.

7.13 Potentielle Redundanzwirkung von Flr und Tsr mit anderen bekannten F-Aktin-depolymerisierenden Faktoren

Die Regulation der Aktin-Dynamik während der Auflösung der FCM-spezifischen Aktin-Plaques scheint zahlreiche Faktoren zu benötigen. So wurden in dieser Arbeit neben Tsr und Flr auch andere bekannte depolymerisierungsfördernde Proteine, wie beispielsweise Twf, Capt, Coronin und Pod1, untersucht. Die Nullmutanten dieser Gene zeigen keinen Fusionsphänotyp. Das Aktinmonomer-bindende Protein Twf ist in zahlreiche Entwicklungsprozesse involviert und interagiert genetisch mit *tsr* während der Borstenmorphogenese (Wahlström *et al.*, 2001). Durch die Generierung der *tsr;twf*-Doppelmutanten konnte diese Interaktion nicht für die *Drosophila* Myogenese bestätigt werden. Das Zusammenwirken von *tsr*, *twf* und *flr* könnte zusätzlich auf Dosis-sensitive Interaktion überprüft werden. Dazu soll im homozygoten *tsr* mutanten Hintergrund ein heterozygoter Zustand von *flr* und *twf* erzeugt und analysiert werden, inwiefern in diesen Mutanten zu einer stärkeren Fusionsstörung kommt. Dem hier zusätzlich untersuchten CAP-Protein Homologen Capulet wird eine bedeutende Rolle in morphogenetischen Vorgängen zugewiesen (Baum *et al.*, 2000; Firth und Baker, 2007), dennoch scheint es während der Myoblastenfusion nicht mit *tsr* zu interagieren. Es stellt sich nun die Frage, welche anderen Moleküle in dem Prozess der Plaque-Auflösung mitwirken könnten.

Coronin ist ein Aktin-bindendes Protein, welches ähnlich zu Flr eine WD40-Domäne besitzt, die als Plattform für die Interaktion mit F-Aktin und anderen regulatorischen Proteinen fungiert. Um eine Balance zwischen Aktin-Polymerisierung und Depolymerisierung in Hefezellen aufrechtzuerhalten interagiert es genetisch mit Cofilin (Goode *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2010). Zudem konnte in Wachstumsprozessen des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* ein Zusammenwirken von Coronin und Aip1 nachgewiesen werden (Ishikawa-Ankerhold *et al.*, 2010). Bezüglich der Funktion des *Drosophila* homologen Proteins Coro ist bislang nur wenig bekannt. Die in dieser Arbeit durchgeführte *in situ*-Hybridisierung deuten auf eine maternale Komponente sowie eine potentielle Transkriptlokalisation in den fusionsrelevanten Stadien hin. Dennoch identifizierte die phänotypische Analyse einer Funktionsverlustmutante und einer defizienten Linie keine Veränderung des Muskelmusters,

7. DISKUSSION

was auf mögliche Redundanzen zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Demzufolge sollte Coro näher untersucht und eine genetische Interaktion mit *flr* und *tsr* überprüft werden.

Ein weiteres Coronin-ähnliches Protein ist Pod1, welches zunächst aus *C.elegans* Proteinextrakten basierend auf Bindung an F-Aktin isoliert wurde (Rappleye *et al.*, 1999). In *Drosophila* nicht-muskulären SL2-Zellen wurde Pod1 als ein quervernetzendes Protein zwischen F-Aktin und Mikrotubuli charakterisiert (Rothenberg *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde das *pod1*-Transkript im embryonalen zentralen Nervensystem nachgewiesen, während das Protein an der Spitze der wachsenden Axone lokalisiert. Die Koordination zwischen Aktin und den Mikrotubuli ist wichtig für die Dynamik des Zytoskeletts und den Zusammenhalt funktionell zusammengehörender Proteine. Während der Myoblastenfusion von *Drosophila* scheint der Verlust des *pod1* keine Störungen hervorzurufen (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise beobachteten Ren *et al.* (2007), dass in den Flügelhaarzellen der *flr* und *tsr*-Mutanten neben der erhöhten F-Aktin-Akkumulation zu einer dramatischen Erhöhung des Tubulinlevels kommt. Dies bestätigt, dass das Aktin und Mikrotubuli Zytoskelett miteinander verbunden sein müssen. Während der Myoblastenfusion werden zahlreiche Proteine an die Stelle der Kontaktmembranen rekrutiert um die FuRMAS zu bilden. Dabei können die kürzeren Strecken mit Hilfe von Myosinen, einer Klasse der Motorproteine, überwunden werden. Kürzlich wurde Myosin heavy chain-like (Mhcl) Protein vorgestellt, das zusammen mit Aktin an der Weitung der Fusionsporen beteiligt ist. Während der Fusion lokalisiert es am Zellkontakt und interagiert mit dem FC-spezifischen Adapterprotein Rols7 (Bonn *et al.*, 2012). Aufgrund des Wildtyp-ähnlichen *pod1*-mutanten Phänotyps kann daher postuliert werden, dass wenn Pod1 bei der Verknüpfung von F-Aktin und Mikrotubuli eine Rolle spielen sollte, würde dies die Involvierung anderer redundant wirkender Faktoren benötigen. Experimentell sollte zunächst die Proteinexpression mittels Generierung transgener *pod1*-GFP-Linie nachgewiesen werden. Lokalisiert das Protein an der Zellkontaktstelle, so wäre die Herstellung von Doppelmутanten, zum Beispiel mit Mhcl oder anderen Aktin-depolymerisierenden Faktoren, der nächste analytische Schritt.

Insgesamt kann postuliert werden, dass bei der Auflösung der dynamischen Aktin-Plaques Aktin-depolymerisierende Faktoren benötigt werden. Aufgrund der nichtvorhandenen Fusionsstörungen der untersuchten Mutanten muss dieser scheinbar komplexere Prozess noch weiter unter Beachtung von potentiellen Redundanzen untersucht werden.

8. Literaturverzeichnis

Abdul-Manan N., Aghazadeh B., Liu G.A., Majumdar A., Ouerfelli O., Siminovitch K.A., Rosen M.K. (1999) Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the 'Wiskott-Aldrich syndrome' protein. *Nature*. 399(6734):379-83

Abmayr S.M., **Pavlat** G.K. (2012) Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development*. 139(4):641-56

Aguel M., Röder L., Vola C., Griffin-Shea R. (1992) A *Drosophila* rotund transcript expressed during spermatogenesis and imaginal disc morphogenesis encodes a protein which is similar to human Rac GTPase-activating (racGAP) proteins. *Mol Cell Biol*. 12(11):5111-22

Agnew B.J., Minamide L.S., Bamburg J.R. (1995) Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem*. 270(29):17582-7

Ahern-Djamali S.M., Bachmann C., Hua P., Reddy S.K., Kastenmeier A.S., Walter U., Hoffmann F.M. (1999) Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* enabled. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(9):4977-82

Ahern-Djamali S.M., Comer A.R., Bachmann C., Kastenmeier A.S., Reddy S.K., Beckerle M.C., Walter U., Hoffmann F.M. (1998) Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains. *Mol Biol Cell*. 9(8):2157-71

Ahmed S., Lee J., Wen L.P., Zhao Z., Ho J., Best A., Kozma R., Lim L. (1994) Breakpoint cluster region gene product-related domain of n-chimaerin. Discrimination between Rac-binding and GTPase-activating residues by mutational analysis. *J Biol Chem*. 269(26):17642-8

Albert M.L., Kim J.I., Birge R.B. (2000) alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol*. 2(12):899-905

Antón I.M., Lu W., Mayer B.J., Ramesh N., Geha R.S. (1998) The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *J Biol Chem*. 273(33):20992-5.

Arber S., Barbayannis F.A., Hanser H., Schneider C., Stanyon C.A., Bernard O., Caroni P. (1998) Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 393(6687):805-9

- Artero** R.D., Castanon I., Baylies M.K. (2001) The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signaling. *Development*. 128(21):4251-64
- Aspenström** P. (1999) The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res*. 246(1):20-5.
- Bachmann** C., Fischer L., Walter U., Reinhard M. (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem*. 274(33):23549-57
- Balagopalan** L., Chen M.H., Geisbrecht E.R., Abmayr S.M. (2006) The CDM superfamily protein Mbc directs myoblast fusion through a mechanism that requires phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate binding but is independent of direct interaction with DCrk. *Mol Cell Biol*. 26(24):9442-5
- Balcer** H.I., Goodman A.L., Rodal A.A., Smith E., Kugler J., Heuser J.E., Goode B.L. (2003) Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, Cofilin, Profilin, and Aip1. *Curr Biol*. 13(24):2159-69
- Bamburg** J.R. (1999) Proteins of the ADF/Cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 185-230
- Bartel** S., Karczewski P., Krause E.G. (1993) Protein phosphorylation and cardiac function: cholinergic-adrenergic interaction. *Cardiovasc Res*. 27(11):1948-53
- Bate** M. (1990) The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* 110, 791-804
- Bauer** R., Voelzmann A., Breiden B., Schepers U., Farwanah H., Hahn I., Eckardt F., Sandhoff K., Hoch M. (2009) Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in *Drosophila*. *EMBO J*. 28(23):3706-16
- Baum** B., Li W., Perrimon N. (2000) A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during *Drosophila* oogenesis and in yeast. *Curr Biol*. 10(16):964-73
- Baylies** M.K., Bate M, Ruiz-Gomez M. (1998) Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell*. 93(6):921-7
- Bear** J.E., Svitkina T.M., Krause M., Schafer D.A., Loureiro J.J., Strasser G.A., Maly I.V., Chaga O.Y., Cooper J.A., Borisy G.G., Gertler F.B. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*. 109(4):509-21

- Beckett K.** und **Baylies M.K.** (2007) 3D analysis of founder cell and fusion competent myoblast arrangements outlines a new model of myoblast fusion. *Dev. Biol.* 309 (1): 113-25
- Ben-Yaacov S.**, Le Borgne .R, Abramson I., Schweisguth F., Schejter E.D. (2001) Wasp, the *Drosophila* Wiskott-Aldrich syndrome gene homologue, is required for cell fate decisions mediated by Notch signaling. *J Cell Biol.*152(1):1-13
- Benzing T.** Signaling at the slit diaphragm. (2004) *J Am Soc Nephrol.* 15(6):1382-91
- Berger S.**, Schäfer G., Kesper D.A, Holz A., Eriksson T., Palmer R.H., Beck L., Klämbt C., Renkawitz-Pohl R. und Önel S. (2008) WASP and SCAR have distinct roles in activating the Arp2/3 complex during myoblast fusion. *Journal of Cell Science* 121 (8)
- Bhat R.A.**, Lahaye T., Panstruga R. (2006) The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods.* 2:12
- Billuart P.**, Winter C.G., Maresh A., Zhao X., Luo L. (2001) Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell.* 107(2):195-207
- Birnboim H.C.** und **Doly J.** (1979) rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23
- Bischof J.**, Maeda R.K., Hediger M., Karch F., Basler K. (2007) An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(9):3312-7
- Bogdan S.** und **Klämbt C.** (2003) Kette regulates actin dynamics and genetically interacts with Wave and Wasp. *Development.* 130(18):4427-37
- Bogdan S.**, Grewe O., Strunk M., Mertens A., Klämbt C. (2004) Sra-1 interacts with Kette and Wasp and is required for neuronal and bristle development in *Drosophila*. *Development.* 2004 131(16):3981-9
- Bonn B.R.**, Rudolf A., Hornbruch-Freitag C., Daum G., Kuckwa J., Kastl L., Buttgereit D., Renkawitz-Pohl R. (2012) Myosin heavy chain-like localizes at cell contact sites during *Drosophila* myoblast fusion and interacts in vitro with Rolling pebbles 7. *Exp Cell Res.* 319(4):402-16
- Botella J.** und **Schneuwly S.** (2004) *Drosophila melanogaster*: Ein Modellsystem zur Analyse neurodegenerativer Erkrankungen, *Biospectrum* 5: 626-628
- Bour B.A.**, Chakravarti M., West J.M., Abmayr S.M. (2000) *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev.* 14(12):1498-511

- Brand** A.H. und **Perrimon** N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118(2): 401-415
- Brock** A.R., Wang Y., Berger S., Renkawitz-Pohl R., Han V.C., Wu Y., Galko M.J. (2012) Transcriptional regulation of Profilin during wound closure in *Drosophila* larvae. *Cell Sci.* 125(Pt 23):5667-76
- Bronk** P., Wenniger J.J., Dawson-Scully K., Guo X., Hong S., Atwood H.L., Zinsmaier K.E. (2001) *Drosophila* Hsc70-4 is critical for neurotransmitter exocytosis in vivo. *Neuron*. 30(2):475-88
- Bruinsma** S.P., Cagan R.L., Baranski T.J. (2007) Chimaerin and Rac regulate cell number, adherens junctions, and ERK MAP kinase signaling in the *Drosophila* eye. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(17):7098-103
- Buday** L., Wunderlich L., Tamás P. (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal*. 14(9):723-31
- Campellone** K.G. und **Welch** M.D. (2010) A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11(4):237-51
- Carl** U.D., Pollmann M., Orr E., Gertler F.B., Chakraborty T., Wehland J. (1999) Aromatic and basic residues within the EVH1 domain of VASP specify its interaction with proline-rich ligands. *Curr Biol*. 9(13):715-8
- Carlier** M.F., Didry D., Pantaloni D. (1997) Hydrolysis of GTP associated with the formation of tubulin oligomers is involved in microtubule nucleation. *Biophys J*. 73(1):418-27
- Carmena** A., Speicher S., Baylies M. (2006) The PDZ protein Canoe/AF-6 links Ras-MAPK, Notch and Wingless/Wnt signaling pathways by directly interacting with Ras, Notch and Dishevelled. *PLoS One*. 20;1:e66
- Castrillon** D.H., Gönczy P., Alexander S., Rawson R., Eberhart C.G., Viswanathan S., DiNardo S., Wasserman S.A. (1993) Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics*. 135(2):489-505
- Chen** E.H. und **Olson** E.N. (2005) Unveiling the mechanisms of cell-cell fusion. *Science* 308(5720): 369-73

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Chen** G.C., Lee J.Y., Tang H.W., Debnath J., Thomas S.M., Settleman J. (2008) Genetic interactions between *Drosophila melanogaster* Atg1 and paxillin reveal a role for paxillin in autophagosome formation. *Autophagy*. 4(1):37-45
- Chen** J., Godt D., Gunsalus K., Kiss I., Goldberg M. und Laski F.A. (2001) Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nature Cell Biology* 3, 204 – 209
- Chhabra** E.S. und **Higgs** H.N. (2007) The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 9(10):1110-21
- Chou** H.C., Antón I.M., Holt M.R., Curcio C., Lanzardo S., Worth A., Burns S., Thrasher A.J., Jones G.E., Calle Y. (2006) WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Curr Biol.* 16(23):2337-44
- Chu** D., Pan H., Wan P., Wu J., Luo J., Zhu H., Chen J. (2012) AIP1 acts with cofilin to control actin dynamics during epithelial morphogenesis. *Development*. 139(19):3561-71
- Clark** M.G., Teply J., Haarer B.K., Viggiano S.C., Sept D., Amberg D.C. (2006) A genetic dissection of Aip1p's interactions leads to a model for Aip1p-cofilin cooperative activities. *Mol Biol Cell.* 17(4):1971-84
- Clark** S.J., Newland P., Yoxall C.W., Subhedar N.V. (2001) Cardiac troponin T in neonates. *Acta Paediatr.* 90(8):957
- Cooley** L., Verheyen E., Ayers K. (1992) *chickadee* encodes a *profilin* required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell.* 69(1):173-84
- Côté** J.F. und **Vuori** K. (2007) GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 17(8):383-93
- D'Avino** P.P., Savoian M.S., Glover D.M. (2004) Mutations in *sticky* lead to defective organization of the contractile ring during cytokinesis and are enhanced by Rho and suppressed by Rac. *J Cell Biol.* 166(1):61-71
- Delon** I. und **Brown** N.H. (2007) Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 43-50
- DeMali** K.A., Wennerberg K., Burridge K. (2003) Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 15(5):572-82
- Didsbury** J., Weber R.F., Bokoch G.M., Evans T., Snyderman R. (1989) *rac*, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem.* 264(28):16378-82

Dobberstein S.K., Fetter R.D., Mehta A.Y., Goodman C.S. (1997) Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the pre-fusion complex. J. Cell Bio. 136: 1249-1261

Doktorarbeit Christine **Dottermusch** (2010) Der Arf-GEF Schizo fördert die Fusion der Myoblasten über die Aktivierung der D-Arf1 GTPase während der frühen Myogenese von *Drosophila melanogaster*, während der Arf-GAP-D-Git in Kooperation mit D-Arf6 die Wegfindung der Muskeln in der späten Myogenese beeinflusst

Doktorarbeit Verena **Groth** (2011) Genetische und bioschemische Analysen zur Regulation vom N-Cadherin durch den Arf-GEF Schizo und zur Arp2/3-Komplex vermittelten F-Aktin Bildung während der Myoblastenfusion von *Drosophila melanogaster*

Doktorarbeit, Balasankara Reddy **Kaipa** (2011) Linking IgSF-mediated cell adhesion with Arp2/3-based actin polymerization during *Drosophila* myoblast fusion

Doktorarbeit Roxane Henriette **Schröter** (2006) Unterschiedliche Rollen des Adaptor-Proteins Blown fuse/Skap-Hom/Scap2 und des Aktin-Regulators Kette/Hem2/Nap1 während der somatischen und viszeralen Myogenese von *Drosophila melanogaster*

Duan H., Skeath J.B., Nguyen H.T. (2001) *Drosophila* Lame duck, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development. Development 128: 4489-4500

Duan R., Jin P., Luo F., Zhang G., Anderson N., Chen E.H. (2012) Group I PAKs function downstream of Rac to promote podosome invasion during myoblast fusion in vivo. J Cell Biol. 199(1):169-85

Dworak H.A. und **Sink** H. (2002) Myoblast fusion in *Drosophila*. Bioessays. 24(7):591-601

Dworak H.A., Charles M.A., Pellerano L.B., Sink H. (2001) Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human *nephrin*. Development 128: 4265-4276

Eden S., Rohatgi R., Podtelejnikov A.V., Mann M., Kirschner M.W. (2002) Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. Nature. 418(6899):790-3

Estojak J., Brent R., Golemis E.A. (1995) Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. Mol Cell Biol. 15(10):5820-9

Estrada B., Casares F., Sánchez-Herrero E. (2003) Development of the genitalia in *Drosophila melanogaster*. Differentiation 71(6):299-310

- Etienne-Manneville S.** (2004) Actin and microtubules in cell motility: which one is in control? *Traffic* 5(7):470-7
- Fanto M.**, Weber U., Strutt D.I., Mlodzik M. (2000) Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye. *Curr Biol.* 10(16):979-88
- Feig L.A.** (1999) Tools of the trade: use of dominant-inhibitory mutants of Ras-family GTPases. *Nat Cell Biol.* 1(2):E25-7
- Fields S.** und **Song O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340(6230):245-6
- Firth L.C.** und **Baker N.E.** (2007) Spitz from the retina regulates genes transcribed in the second mitotic wave, peripodial epithelium, glia and plasmatocytes of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Dev Biol.* 307(2):521-38
- Fox D.T.** und **Peifer M.** (2007) Cell adhesion: separation of p120's powers? *Curr Biol* 17(1):R24-7
- Frasch M.** (1999) Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 9(5):522-9
- Fritz J.L.** und **VanBerkum M.F.** (2002) Regulation of rho family GTPases is required to prevent axons from crossing the midline. *Dev Biol.* 252(1):46-58
- Galletta B. J.**, Chakravarti M., Banerjee R., Abmayr S. M. (2004) SNS: adhesive properties, localization requirements and ectodomain dependence in S2 cells and embryonic myoblasts. *Mech. Dev.* 121, 1455-1468
- Garcia-Bellido A.** und **Dapena J.** (1974) Induction, detection and characterization of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol Gen Genet.* 128(2):117-30
- Garg P.**, Verma R., Nihalani D., Johnstone D.B., Holzman L.B. (2007) Nephrin cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol.* 27(24):8698-712
- Geese M.**, Loureiro J.J., Bear J.E., Wehland J., Gertler F.B., Sechi A.S. (2002) Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol Biol Cell.* 13(7):2383-96
- Geese M.**, Schlüter K., Rothkegel M., Jockusch B.M., Wehland J., Sechi A.S. (2000) Accumulation of profilin II at the surface of Listeria is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci.* 113 (Pt 8):1415-26

- Geisbrecht** E.R. und Montell D.J. (2004) A role for *Drosophila* IAP1-mediated caspase inhibition in Rac-dependent cell migration. *Cell*. 118(1):111-25
- Geisbrecht** E.R., Haralalka S., Swanson S.K., Florens L., Washburn M.P., Abmayr S.M. (2008) *Drosophila* ELMO/CED-12 interacts with Myoblast city to direct myoblast fusion and ommatidial organization. *Dev Biol*. 314(1):137-49
- Gerke** P., Huber T.B., Sellin L., Benzing T., Walz G. (2003) Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*. 14(4):918-26
- Gertler** F.B., Bennett R.L., Clark M.J., Hoffmann F.M. (1989) *Drosophila* abl tyrosine kinase in embryonic CNS axons: a role in axonogenesis is revealed through dosage-sensitive interactions with disabled. *Cell*. 58(1):103-13
- Getsios** S., Huen A.C., Green K.J. (2004) Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(4):271-81
- Gietz** D., St Jean A., Woods R.A., Schiestl R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*. 20(6):1425
- Gildor** B., Massarwa R., Shilo B.Z., Schejter E.D. (2009) The SCAR and WASp nucleation-promoting factors act sequentially to mediate *Drosophila* myoblast fusion. *EMBO Rep*. 10: 1043–1050
- Gohl** C., Banovic D., Grevelhörster A., Bogdan S. (2010) WAVE forms hetero- and homo-oligomeric complexes at integrin junctions in *Drosophila* visualized by bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem*. 285(51):40171-9
- Gohla** A., Birkenfeld J., Bokoch G.M. (2005) Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat Cell Biol*. 7(1):21-9
- Goode** B.L., Drubin D.G., Lappalainen P. (1998) Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by Twinfilin, a ubiquitous actin monomer sequestering protein. *J. Cell Biol.*, 142(3): 723–733
- Goode** B.L. und **Eck** M.J. (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*. 76:593-627
- Grevengeod** E.E., Loureiro J.J., Jesse T.L., Peifer M. (2001) Abelson kinase regulates epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *J Cell Biol* 155(7):1185-98

- Grosshans** J., Wenzl C., Herz H.M., Bartoszewski S., Schnorrer F., Vogt N., Schwarz H., Müller H.A. (2003) RhoGEF2 and the formin Dia control the formation of the furrow canal by directed actin assembly during *Drosophila* cellularisation. *Development*. 132(5):1009-20
- Guichard** A., Bergeret E., Griffin-Shea R. (1997) Overexpression of RnRacGAP in *Drosophila melanogaster* deregulates cytoskeletal organisation in cellularising embryos and induces discrete imaginal phenotypes. *Mech Dev*. 61(1-2):49-62
- Gunsalus** K.C., Bonaccorsi S., Williams E., Verni F., Gatti M. und Goldber M.L. (1995) Mutations in *twinstar*, a *Drosophila* gene encoding a Cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, Vol 131, 1243-1259
- Gyuris** J., Golemis E., Chertkov H., Brent R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*. 75(4):791-803
- Hakeda-Suzuki** S., Ng J., Tzu J., Dietzl G., Sun Y., Harms M., Nardine T., Luo L., Dickson B.J(2002) Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 41: 438-442
- Haralalka** S., Shelton C., Cartwright H.N., Katzfey E., Janzen E., Abmayr S.M. (2011) Asymmetric Mbc, active Rac1 and F-actin foci in the fusion-competent myoblasts during myoblast fusion in *Drosophila*. *Development*. 138(8):1551-62
- Harden** N., Loh H.Y., Chia W., Lim L.A. (1995) Dominant inhibitory version of the small GTP-binding protein Rac disrupts cytoskeletal structures and inhibits developmental cell shape changes in *Drosophila*. *Development*. 121(3):903-14
- Heasman** S.J., Ridley A.J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(9):690-701
- Hill** K.K., Bedian V., Juang J.L., Hoffmann F.M. (1995) Genetic interactions between the *Drosophila* Abelson (Abl) tyrosine kinase and failed axon connections (fax), a novel protein in axon bundles. *Genetics*. 141(2):595-606
- Hopmann** R. und Miller K.G. (2003) A Balance of Capping Protein and Profilin Functions Is Required to Regulate Actin Polymerization in *Drosophila* Bristle. *Mol Biol Cell*. 14(1): 118–128
- Hornbruch-Freitag** C., Griemert B., Buttgereit D., Renkawitz-Pohl R. (2011) *Drosophila* Swiprosin-1/EFHD2 accumulates at the prefusion complex stage during *Drosophila* myoblast fusion. *J Cell Sci*. 124(Pt 19):3266-78

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Hrdlicka** L., Gibson M., Kiger A., Micchelli C., Schober M., Schöck F., Perrimon N. (2002) Analysis of twenty-four Gal4 lines in *Drosophila melanogaster*. *Genesis*. 34(1-2):51-7
- Hummel** T., Leifker K., Klämbt C. (2000) The *Drosophila* HEM-2/NAP1 homolog KETTE controls axonal pathfinding and cytoskeletal organization. *Genes Dev.* 14(7):863-73
- Ishikawa-Ankerhold** H.C., Gerisch G., Müller-Taubenberger A. (2010) Genetic evidence for concerted control of actin dynamics in cytokinesis, endocytic traffic, and cell motility by coronin and Aip1. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 67(7):442-55
- Ismail** A.M., Padrick S.B., Chen B., Umetani J., Rosen M.K. (2009) The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat Struct Mol Biol.* 16(5):561-3
- Ito** T., Ito A., Hieda K., Kobayashi K. (1983) Wavelength dependence of inactivation and membrane damage to *Saccharomyces cerevisiae* cells by monochromatic synchrotron vacuum-uv radiation (145-190 nm). *Radiat Res.* 96(3):532-48
- Jaffe** A.B. und **Hall** A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:247-69
- James** P., Halladay J., Craig E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*. 144(4):1425-36
- Jasper** H., Benes V., Schwager C., Sauer S., Clauder-Münster S., Ansorge W., Bohmann D. (2001) The genomic response of the *Drosophila* embryo to JNK signaling. *Dev Cell*. 1(4):579-86
- Jin** P., Duan R., Luo F., Zhang G., Hong S.N., Chen E.H. (2011) Competition between Blown fuse and WASP for WIP binding regulates the dynamics of WASP-dependent actin polymerization in vivo. *Dev Cell*. 20(5):623-38
- Jones** N., Blasutig I.M., Eremina V., Ruston J.M., Blatt F., Li H., Huang H., Larose L., Li S.S., Takano T., Quaggin S.E., Pawson T. (2006) Nck adaptor proteins link Nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*. 440(7085):818-23
- Kaipa** B.R., Shao H., Schäfer G., Trinkewitz T., Groth V., Liu J., Beck L., Abmayr S.M., Önel S.F. (2013) Dock mediates Scar- and WASp-dependent actin polymerization through interaction with cell adhesion molecules in founder cells and fusion-competent myoblasts. *J Cell Sci*. Sep 19
- Karess** R.E., Rubin G.M. (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell*. 38(1):135-46

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Kaufmann** N., Wills Z.P., Van Vactor D. (1998) *Drosophila* Rac1 controls motor axon guidance. Development. 125(3):453-61
- Kennison** J.A. und **Tamkun** J.W. (1988) Dosage-dependent modifiers of *polycomb* and *antennapedia* mutations in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 85(21):8136-40
- Kerppola** T.K. (2008) Overcoming uncertainty through advances in fluorescence imaging of molecular processes in cells. Methods. 45(3):183-4
- Kesper** D.A., Stute C., Buttgerit D., Kreisköther N., Vishnu S., Fischbach K.F., Renkawitz-Pohl R. (2007) Myoblast fusion in *Drosophila melanogaster* is mediated through a fusion-restricted myogenic-adhesive structure (FuRMAS). Dev. Dyn. 236: 404-415
- Kim** E., Wriggers W., Phillips M., Kokabi K., Rubenstein P.A., Reisler E. (2000) Cross-linking constraints on F-actin structure. J Mol Biol. 299(2):421-9
- Kim** M.D., Kamiyama D., Kolodziej P., Hing H., Chiba A. (2003) Isolation of Rho GTPase effector pathways during axon development. Dev Biol. Oct 15;262(2):282-93.
- Kim** S., Shilagardi K., Zhang S., Hong S. N., Sens K.L., Bo J., Gonzalez G. A., und Chen E.H. (2007) A critical function for the actin cytoskeleton in targeted exocytosis of prefusion vesicles during myoblast fusion. Developmental Cell 12, 571-586
- Kim** Y.S., Furman S., Sink H., VanBerkum M.F. (2001) Calmodulin and profilin coregulate axon outgrowth in *Drosophila*. J Neurobiol. 47(1):26-38
- Kitamura** T., Kitamura Y., Yonezawa K., Totty N.F., Gout I., Hara K., Waterfield M.D., Sakaue M., Ogawa W., Kasuga M. (1996) Molecular cloning of p125Nap1, a protein that associates with an SH3 domain of Nck. Biochem Biophys Res Commun. 219(2):509-14
- Kobayashi** K., Kuroda S., Fukata M., Nakamura T., Nagase T., Nomura N., Matsuura Y., Yoshida-Kubomura N., Iwamatsu A., Kaibuchi K. (1998) p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. J Biol Chem. 273(1):291-5
- Koronakis** V., Hume P.J., Humphreys D., Liu T., Hørning O., Jensen O.N., McGhie E.J. (2011) WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arp and Rac1. Proc Natl Acad Sci U S A. 108(35):14449-54
- Krause** M., Dent E.W., Bear J.E., Loureiro J.J., Gertler F.B. (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol. 19:541-64 Review.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Krause** M., Sechi A.S., Konradt M., Monner D., Gertler F.B., Wehland J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 149(1):181-94
- Kunda** P., Craig G., Dominguez V., Baum B.(2003) Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of SCAR/WAVE to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol.* 13(21):1867-75
- Lappalainen** P., Kessels M.M., Cope M.J.T.V., Drubin D.G. (1998) The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. *Mol. Biol. Cell.* 9: 1951–1959
- Lawrence** P. A. und **Jonston** P. (1989) Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *even skipped* and *fushi tarazu*. *Development.* 105, 761-768
- Lebensohn** A.M. und **Kirschner** M.W. (2009) Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell.* 36(3):512-24
- Li** B. und **Fields** S.(1993) Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* 7(10):957-63
- Li** H., Lemay S., Aoudjit L., Kawachi H., Takano T. (2004) SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin. *J Am Soc Nephrol.* 15(12):3006-15
- Liebl** E.C., Forsthoefel D.J., Franco L.S., Sample S.H., Hess J.E., Cowger J.A., Chandler M.P., Shupert A.M., Seeger M.A. (2000) Dosage-sensitive, reciprocal genetic interactions between the Abl tyrosine kinase and the putative GEF trio reveal trio's role in axon pathfinding. *Neuron.* 26(1):107-18
- Lin** C.W., Yen S.T., Chang H.T., Chen S.J., Lai S.L., Liu Y.C., Chan T.H., Liao W.L., Lee S.J. (2010) Loss of *cofilin 1* disturbs actin dynamics, adhesion between enveloping and deep cell layers and cell movements during gastrulation in zebrafish. *PLoS One.* 5(12):e15331
- Lin** T.Y., Huang C.H., Kao H.H., Liou G.G., Yeh S.R., Cheng C.M., Chen M.H., Pan R.L., Juang J.L. (2009) Abi plays an opposing role to Abl in *Drosophila* axonogenesis and synaptogenesis. *Development.*;136(18):3099-107
- Lindberg** U., Karlsson R. (2008) Actin is where it's at. *Semin Cancer Biol.* 18(1):1
- Lindsley** D.L. und **Zimm** G.G. (1992) The Genome of *Drosophila melanogaster*. viii + 1133pp

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Lundström A.**, Gallio M., Englund C., Steneberg P., Hemphälä J., Aspenström P., Keleman K., Falileeva L., Dickson B.J., Samakovlis C. (2004) Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons. *Genes Dev.* 18(17):2161-71
- Luo L.**, Liao Y.J., Jan L.Y., Jan Y.N. (1994) Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* 8(15):1787-802
- Massarwa R.**, Carmon S., Shilo B. und Schejter E. D. (2007) WIP/WASp-based Actin-Polymerization Machinery is essential for Myoblast Fusion in *Drosophila*. *Developmental Cell* 12, 557–569
- Masterarbeit Julia **Hamp** (2012) Zelladhäsion und Aktin-regulation: Die Funktion von Graf während der Myoblastenfusion und die Myoblasten-spezifische Aktivierung des Arp2/3-Komplexes durch Kette.
- McGough A.**, Pope B., Chiu W. und Weeds A. (1997) Cofilin Changes the Twist of F-Actin: Implications for Actin Filament Dynamics and Cellular Function. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 138, Nr. 4, 1997 771-781
- Menon S.D.** und **Chia W.** (2001) *Drosophila* rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev Cell.* 1(5):691-703
- Miki H.**, Yamaguchi H., Suetsugu S., Takenawa T. (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature.* 408(6813):732-5
- Mohler W.A.**, Simske J.S., Williams-Masson E.M., Hardin J.D., White J.G. (1998) Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis. *Curr Biol.* 8(19):1087-90
- Moreau V.**, Frischknecht F., Reckmann I., Vincentelli R., Rabut G., Stewart D., Way M. (2000) A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol.* 2(7):441-8
- Morgan T.E.**, Lockerbie R.O., Minamide L.S., Browning M.D., Bamberg J.R. (1993) Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J Cell Biol.* 122(3):623-33
- Moriyama K.**, Yahara I. (2002) Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover. *J Cell Sci.* 115(Pt 8):1591-601

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Moseley** J.B., Okada K., Balcer H.I., Kovar D.R., Pollard T.D., Goode B.L. (2006) Twinfilin is an actin-filament-severing protein and promotes rapid turnover of actin structures in vivo. *J Cell Sci.* 119(Pt 8):1547-57
- Mullis** K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology.* 24:17-27
- Murakami** S., Umetsu D., Maeyama Y., Sato M., Yoshida S., Tabata T. (2007) Focal adhesion kinase controls morphogenesis of the *Drosophila* optic stalk. *Development.* 134(8):1539-48 Epub 2007 Mar 14
- Niwa** R., Nagata-Ohashi K., Takeichi M., Mizuno K., Uemura T. (2002) Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell.* 108(2):233-46
- Nowak** S.J., Nahirney P.C., Hadjantonakis A.K., Baylies M.K. (2009) Nap1-mediated actin remodeling is essential for mammalian myoblast fusion. *J Cell Sci.* 122(Pt 18):3282-93
- Okada** K., Obinata T., Abe H. (1999) XAIP1: a *Xenopus* homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J Cell Sci.* 112 (Pt 10):1553-65
- Okada** K., Blanchoin L., Abe H., Chen H., Pollard T.D., Bamburg J.R. (2002) *Xenopus* actin-interacting protein 1 (XAip1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends. *J Biol Chem.* Nov 8;277(45):43011-6
- Okada** K., Ravi H., Smith E.M., Goode B.L. (2006) Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell.* 17(7):2855-68
- Önel** S. (2009) Actin regulators take the reins in *Drosophila* myoblast fusion. *Cent. Eur. J. Biol.* 4(1)
- Önel** S. und **Renkawitz-Pohl** R. (2009) FuRMAS: Triggering myoblast fusion in *Drosophila*. *Developmental Dynamics* 238:1513-1525
- Ono** S. (2001) The *Caenorhabditis elegans* unc-78 gene encodes a homologue of actin-interacting protein 1 required for organized assembly of muscle actin filaments. *J Cell Biol.* 152(6):1313-9
- Ono** S. (2003) Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments. *Biochemistry.* 42(46):13363-70
- Ono** S. (2007) Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol.* 258:1-82

- Oren-Suissa** M. und **Podbilewicz** B. (2007) Cell fusion during development. *Trends Cell Biol.* 17: 537-546
- Paavilainen** V.O., Berting E., Falck S., Lappalainen P. (2004) Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in Cell Biology*, Vol. 14, Nr. 7
- Palmgren** S., Ojala P.J., Wear M.A., Cooper J.A., Lappalainen P. (2001) Interactions with PIP2, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin. *J Cell Biol.* 155(2):251-60
- Pantaloni** D. und **Carlier** M.F. (1993) How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell.* 75(5):1007-14
- Papoulas** O., Beek S.J., Moseley S.L., McCallum C.M., Sarte M., Shearn A., Tamkun J.W. (1998) The *Drosophila* trithorax group proteins BRM, ASH1 and ASH2 are subunits of distinct protein complexes. *Development.* 125(20):3955-66
- Papworth** C., Bauer J., Braman J., Wright D. (1996) Site-directed mutagenesis in one day with .80% efficiency. *Strategies* 9:3–4
- Paul** A.S. und **Pollard** T.D. (2009) Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66(8):606-17
- Pham** H., Yu H., Laski F.A. (2008) Cofilin/ADF is required for retinal elongation and morphogenesis of the *Drosophila* rhabdomere. *Dev Biol.* 318(1):82-91.
- Pollard** T. (2007) Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36: 451-77
- Pollard** T.D., Blanchoin L., Mullins R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;29:545-76
- Prado** A., Canal I., Barbas J.A., Molloy J., Ferrús A. (1995) Functional recovery of troponin I in a *Drosophila* heldup mutant after a second site mutation. *Mol Biol Cell.* 6(11):1433-41
- Quilliam** L.A., Lambert Q.T., Mickelson-Young L.A., Westwick J.K., Sparks A.B., Kay B.K., Jenkins N.A., Gilbert D.J., Copeland N.G., Der C.J. (1996) Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling. *J Biol Chem.* 271(46):28772-6
- Ranganayakulu** G., Schulz R.A., Olson E.N. (1996) Wingless signaling induces nautilus expression in the ventral mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol.* 176(1):143-8

- Rappleye** C.A., Paredes A.R., Smith C.W., McDonald K.L., Aroian R.V. (1999) The coronin-like protein POD-1 is required for anterior-posterior axis formation and cellular architecture in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 13(21):2838-51
- Rau** A., Buttgerit D., Holz A., Fetter R., Doberstein S. K., Paululat A., Staudt N., Skeath J., Michelson A.M., Renkawitz-Pohl R. (2001) *rolling pebbles (rols)* is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* 128: 5061-5073
- Read** R.D., Bach E.A., Cagan R.L. (2004) *Drosophila* C-terminal Src kinase negatively regulates organ growth and cell proliferation through inhibition of the Src, Jun N-terminal kinase, and STAT pathways. *Mol Cell Biol.* 24(15):6676-89
- Reinhard** M., Jarchau T., Walter U. (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci.* 26(4):243-9
- Reinhard** M., Jouvenal K., Tripiet D., Walter U. (1995) Identification, purification, and characterization of a zyxin-related protein that binds the focal adhesion and microfilament protein VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(17):7956-60
- Ren** N., Charlton J., Adler P.N. (2007) The flare gene, which encodes the AIP1 protein of *Drosophila*, functions to regulate F-actin disassembly in pupal epidermal cells. *Genetics.* 176(4):2223-34
- Ricard** C.S., Jakubowski J.M., Verbsky J.W., Barbieri M.A., Lewis W.M., Fernandez G.E., Vogel M., Tsou C., Prasad V., Stahl P.D., Waksman G., Cheney C.M. (2001) *Drosophila rab GDI* mutants disrupt development but have normal Rab membrane extraction. *Genesis.* 31(1):17-29
- Richardson** B.E., Beckett K. und Baylies M.K. (2008) Live imaging of *Drosophila* myoblast fusion. *Methods Mol. Biol.* 475: 263-274
- Richardson** B.E., Nowak S.J., Baylies M.K. (2008) Myoblast fusion in fly and vertebrates: new genes, new processes and new perspectives. *Traffic.* 9(7): 1050–1059
- Robinson** R.C., Turbedsky K., Kaiser D.A., Marchand J.B., Higgs H.N., Choe S., Pollard T.D. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 294(5547):1679-84
- Rodriguez** O.C., Schaefer A.W., Mandato C.A., Forscher P., Bement W.M., Waterman-Storer C.M. (2003) Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 5(7):599-609
- Rogers** S.L., Wiedemann U., Stuurman N., Vale R.D. (2003) Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Biol.* 162(6):1079-88

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Rohn** J.L., Sims D., Liu T., Fedorova M., Schöck F., Dopie J., Vartiainen M.K., Kiger A.A., Perrimon N., Baum B. (2011) Comparative RNAi screening identifies a conserved core metazoan actinome by phenotype. *J Cell Biol.* 194(5):789-805
- Rossman** K.L., Der C.J., Sondek J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(2):167-80
- Rothenberg** M.E., Rogers S.L., Vale R.D., Jan L.Y., Jan Y.N. (2003) *Drosophila* pod-1 crosslinks both actin and microtubules and controls the targeting of axons. *Neuron.* 39(5):779-91.
- Roy** S. und **VijayRaghavan** K. (1997) Homeotic genes and the regulation of myoblast migration, fusion, and fibre-specific gene expression during adult myogenesis in *Drosophila*. *Development.* 124(17):3333-41
- Rubin** G.M. und **Spradling** A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science.* 218(4570):348-53
- Ruiz-Gomez** M., Coutts N., Price A., Taylor M.V., Bate M. (2000) *Drosophila* *dumbfounded*: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* 102: 189-198
- Ruiz-Gomez** M., Coutts N., Suster M.L., Landgraf M., Bate M. (2002) *myoblasts incompetent* encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*. *Development* 129:133-141
- Rushton** E., Drysdale R., Abmayr S.M., Michelson A.M., Bate M. (1995) Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development (Camb)* 121:1979–1988
- Sahota** V.K., Grau B.F., Mansilla A., Ferrús A. (2009) Troponin I and Tropomyosin regulate chromosomal stability and cell polarity. *J Cell Sci.* 122(Pt 15):2623-31
- Saiki** R.K., Chang C.A., Levenson C.H., Warren T.C., Boehm C.D, Kazazian HH Jr, Erlich HA. (1988) Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med.* 319(9):537-41
- Sambrook**, J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., 1.25-1.28. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, NY, USA
- Schäfer** G., Weber S., Holz A., Bogdan S., Schumacher S., Müller A., Renkawitz-Pohl R., Onel S.F. (2007) The Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) is essential for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 304: 664-674

- Schenck** A., Bardoni B., Langmann C., Harden N., Mandel J.L., Giangrande A. (2003) CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron*. 38(6):887-98
- Schenck** A., Qurashi A., Carrera P., Bardoni B., Diebold C., Schejter E., Mandel J.L., Giangrande A. (2004) WAVE/SCAR, a multifunctional complex coordinating different aspects of neuronal connectivity. *Dev Biol*. 274(2):260-70
- Schneider** I. (1972) Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*. 27(2):353-65
- Schnorrer** F., Schönbauer C., Langer C.C., Dietzl G., Novatchkova M., Schernhuber K., Fellner M., Azaryan A., Radolf M., Stark A., Keleman K., Dickson B.J. (2010) Systematic genetic analysis of muscle morphogenesis and function in *Drosophila*. *Nature*. 464(7286):287-91
- Schonbaum** C.P., Organ E.L., Qu S., Cavener D.R. (1992) The *Drosophila melanogaster stranded at second (sas)* gene encodes a putative epidermal cell surface receptor required for larval development. *Dev Biol*. 151(2):431-45
- Schröter** R.H., Lier S., Holz A., Bogdan S., Klämbt C., Beck L., Renkawitz-Pohl R. (2004) *kette* and *blown fuse* interact genetically during the second fusion step of myogenesis in *Drosophila*. *Development* 131: 4501-4509
- Sens** K.L., Zhang S., Jin P., Duan R., Zhang G., Luo F., Parachini L., Chen E.H. (2010) An invasive podosome-like structure promotes fusion pore formation during myoblast fusion. *J Cell Biol*. 191(5):1013-27
- Shelton** C., Kocherlakota K.S., Zhuang S., Abmayr S.M. (2009) The immunoglobulin superfamily member Hbs functions redundantly with Sns in interactions between founder and fusion-competent myoblasts. *Development* 136: 1159-1168
- Singh** J., Aaronson S.A., Mlodzik M. (2010) *Drosophila* Abelson kinase mediates cell invasion and proliferation through two distinct MAPK pathways. *Oncogene*. 29(28):4033-45
- Sotillos** S. und **Campuzano** S. (2000) DRacGAP, a novel *Drosophila* gene, inhibits EGFR/Ras signalling in the developing imaginal wing disc. *Development*. 127(24):5427-38
- Strünkelnberg** M., Bonengel B., Moda L.M., Hertenstein A., de Couet H.G., Ramos R.G., Fischbach K.F. (2001) *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* 128:4229-4239

- Suetsugu S.**, Miki H., Takenawa T. (1998) The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J.* 17(22):6516-26
- Sun H.Q.**, Kwiatkowska K., Yin H.L. (1995) Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 7(1):102-10
- Susic-Jung L.**, Hornbruch-Freitag C., Kuckwa J., Rexer K.H., Lammel U., Renkawitz-Pohl R. (2012) Multinucleated smooth muscles and mononucleated as well as multinucleated striated muscles develop during establishment of the male reproductive organs of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 370(1):86-97
- Svitkina T.M.**, Bulanova E.A., Chaga O.Y., Vignjevic D.M., Kojima S., Vasiliev J.M., Borisy G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 160(3):409-21
- Taagepera S.**, McDonald D., Loeb J.E., Whitaker L.L., McElroy A.K., Wang J.Y., Hope T.J. (1998) Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(13):7457-62
- Takenawa T.**, Suetsugu S. (2007) The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):37-48
- Tal T.**, Vaizel-Ohayon D., Schejter E.D. (2002) Conserved interactions with cytoskeletal but not signaling elements are an essential aspect of *Drosophila* WASp function. *Dev Biol.* 243(2):260-71
- Tautz D.** und **Pfeifle C.** (1989) A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals a translational control of the segmentation gene hunchback. Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg
- Tea J.S.** und **Luo L.** (2011) The chromatin remodeling factor Bap55 functions through the TIP60 complex to regulate olfactory projection neuron dendrite targeting. *Neural Dev.* 6:5
- Thomas S.M.** und **Brugge J.S.** (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:513-609
- Tixier H.**, Grevoul J., Loffroy R., Lauferon J., Guiu B., Mutamba W., Filipuzzi L., Cercueil J.P., Douvier S., Krause D., Sagot P. (2010) Preoperative embolization or ligation of the uterine arteries in preparation for conservative uterine fibroma surgery. *Acta Obstet Gynecol Scand.* Oct;89(10):1310-5
- Tsuji T.**, Miyoshi T., Higashida C., Narumiya S., Watanabe N. (2009) An order of magnitude faster AIP1-associated actin disruption than nucleation by the Arp2/3 complex in lamellipodia. *PLoS One.* 4(3):e4921

- Van Aelst** L. und **D'Souza-Schorey** C. (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11(18):2295-322
- Verheyen** E.M. und **Cooley** L. (1994) Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development.* 120(4):717-28
- Wahlström** G., Vartiainen M., Yamamoto L., Mattila P.K., Lappalainen P., Heino T.I. (2001) Twinfilin is required for actin-dependent developmental processes in *Drosophila*. *JBC*, Vol.155, Nr 5, 787-796
- Wang** D., Zhang L., Zhao G., Wahlström G., Heino T.I., Chen J., Zhang Y.Q. (2010) *Drosophila* twinfilin is required for cell migration and synaptic endocytosis. *J Cell Sci.* 123(Pt 9):1546-56
- Wang** G., Woods A., Agoston H., Ulici V., Glogauer M., Beier F. (2007) Genetic ablation of Rac1 in cartilage results in chondrodysplasia. *Dev Biol.* 306(2):612-23
- Wang** J.S., Coburn J.P., Tauber A.I., Zaner K.S. (1997) Role of gelsolin in actin depolymerization of adherent human neutrophils. *Mol Biol Cell.* 8(1):121-8
- Welsh** G.I. und **Saleem** M.A. (2010) Nephlin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol.* 220(3):328-37
- White-Cooper** H., Schäfer M.A., Alphey L.S., Fuller M.T. (1998) Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*. *Development.* 125(1):125-34
- Wills** Z., Emerson M., Rusch J., Bikoff J., Baum B., Perrimon N., Van Vactor D. (2002) A *Drosophila* homolog of cyclase-associated proteins collaborates with the Abl tyrosine kinase to control midline axon pathfinding. *Neuron.* 36(4):611-22
- Wills** Z., Marr L., Zinn K., Goodman C.S., Van Vactor D. (1999) Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron.* 22(2):291-9
- Wright** T. R. F. (1960) The phenogenetics of the embryonic mutant, lethal myospheroid, in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* 143, 77-99
- Xavier** M.J. und **Williams** M.J. (2011) The Rho-family GTPase Rac1 regulates integrin localization in *Drosophila* immunosurveillance cells. *PLoS One.* 6(5):e19504
- Yang** N., Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K. (1998) Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature.* 393(6687):809-12

8. LITERATURVERZEICHNIS

Yokota Y., Ring C., Cheung R., Pevny L., Anton E.S. (2007) Nap1-regulated neuronal cytoskeletal dynamics is essential for the final differentiation of neurons in cerebral cortex. *Neuron*. 54(3):429-45

Zallen J.A., Cohen Y., Hudson A.M., Cooley L., Wieschaus E., Schejter E.D. (2002) SCAR is a primary regulator of Arp2/3-dependent morphological events in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 156(4):689-701

Zhang L., Luo J., Wan P., Wu J., Laski F., Chen J. (2011) Regulation of cofilin phosphorylation and asymmetry in collective cell migration during morphogenesis. *Development*. 138(3):455-64

Zhu Z. und **Bhat** K.M. (2011) The *Drosophila* Hem/Kette/Nap1 protein regulates asymmetric division of neural precursor cells by regulating localization of Inscuteable and Numb. *Mech Dev.* 128(7-10):483-95

9.1 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Susanne Önel für das Überlassen des Themas meiner Doktorarbeit bedanken. Vielen Dank für die Bereitstellung der benötigten Mittel und der Laborräume. Besonders möchte ich mich für sehr viel Geduld und die wertvollen Ratschläge bedanken, die diese Arbeit vorangebracht haben, bedanken. Vor allem aber, herzlichen Dank für die Unterstützung in den letzten Jahren. Susanne, Du hast trotz des Mutterschaftsurlaubes „mit doppelter Belastung“ immer Zeit gefunden, sodass die Arbeiten im Labor sehr fließen verliefen. Vielen Dank auch für das Korrekturlesen von Poster und natürlich auch dieser Arbeit. Zudem bedanke ich mich für das Verständnis und das Entgegenkommen bezüglich meiner familiären Situation und die Mitfahrgelegenheit, die mir das zeitaufwendige Zugfahren erspart hat.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Renkawitz-Pohl für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung durch die wertvollen Tipps und Ratschläge. Ebenso möchte ich mich für alle Vorlesungen, Praktika und Seminare während meines Studiums bedanken. Mit Ihrer Dynamik, Liebe zum gewählten Beruf und enormen Forschungsdrang konnten Sie das Wissen sehr gut vermitteln und mit Ihrer Energie anstecken! Zudem haben Sie, trotz Ihres straffen Terminkalenders, sich immer Zeit genommen und die Gruppengemeinschaft gestärkt. Außerdem danke ich für die gemeinschaftliche Nutzung von Laborräumen und Materialien.

Großer Dank geht an meine lieben Kollegen der AG Önel und Renkawitz-Pohl. Vielen Dank für das tolle Arbeitsklima und viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit. Zudem bedanke ich mich für die vielen Hilfestellungen, Ideen und Tricks, die die Arbeit im Labor erleichterten. Besonders möchte ich mich bei Verena für die Betreuung meiner Masterarbeit und auch später für die wertvollen Tipps bedanken. Für die letzten Etappen meiner Arbeit möchte ich mich herzlich bei Carina bedanken. Gerade am Anfang deiner Doktorarbeit standest Du vor vielen Herausforderungen, die Du sehr gut gemeistert hast! Ein riesengroßes Dankeschön an Sabina und Ljubinka für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag und natürlich für die Fliegeninjektion – Sabina, vielen Dank! Weiterhin möchte ich bei Christine für die netten Ratschläge und Hilfsbereitschaft sowie bei Christina für das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung geht an Katja. Vielen Dank für die netten Workshops.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, ohne die mein Studium und die Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Liebend Dank für Eure Unterstützung und Aufmunterungen in schwierigen Situationen. Besonders möchte ich mich bei Sascha und Maxim bedanken. Ich liebe Euch!

9.2 Erklärung gem. § 5 der Promotionsordnung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation

**„Genetische und biochemische Analysen zur Regulation der Arp2/3-Komplex
vermittelten F-Aktin-Plaques Bildung und Auflösung während der Myoblastenfusion
von *Drosophila melanogaster*“**

unter der Leitung von Prof. Dr. Susanne Önel am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst, keine anderen als hier angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und alle vollständig oder sinngemäß übernommene Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die Dissertation ist in der vorliegenden oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht worden.

Marburg, den

(Tatjana Trinkewitz, Verfasser)

